

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. lékařská fakulta

DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2016

MUDr. Aneta Klímová

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**Mechanismy patogeneze experimentální autoimunitní uveitidy
a možnosti jejich ovlivnění**

Doktorská dizertační práce

MUDr. Aneta Klímová

Praha 2016

Školitel: Doc. MUDr. Jarmila Heissigerová, Ph.D., MBA

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Petra Svozílková, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.4.2016

Aneta Klímová

Identifikační záznam

KLÍMOVÁ, Aneta. Mechanismy patogeneze experimentální autoimunitní uveitidy a možnosti jejich ovlivnění. [*The Mechanisms of Pathogenesis of Experimental Autoimmune Uveitis and Possibilities of Their Regulation*]. Praha, 2016. 90 s., 4 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Oční klinika. Školitel Heissigerová, Jarmila.

Poděkování

Ráda bych srdečně poděkovala své školitelce doc. MUDr. Jarmile Heissigerové, Ph.D., MBA za velkou podporu a pozitivní motivaci po celou dobu mého doktorandského studia. Děkuji za milý a laskavý přístup, trpělivost při práci i společných dlouhých diskuzích, za nadšení, jaké ve mně vzbudila k experimentální práci a problematice uveitid.

Velké poděkování patří také doc. MUDr. Petře Svozílkové, Ph.D. V pozici školitel konzultant mi byla důležitou oporou, s náhledem na problematiku mi pomáhala po stránce odborné i organizační.

Dále děkuji za výbornou spolupráci, lidský a pozitivní přístup MUDr. Petře Seidler Štangové, bez které by nebylo možné experimenty provádět.

Díky velkorysé podpoře prof. MUDr. Ondřeje Slanaře, Ph.D. a prof. Dr. Hassana Farghalihho, DrSc. z Farmakologického ústavu 1. lékařské fakulty, Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze jsme mohli využívat technické zázemí laboratoře a zvěřince. V denním provozu nám zde pomáhali laborantky Jana Plačková a Libuše Šlehobrová.

Velice děkuji doc. MUDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy v Praze za významnou pomoc a podporu v oblasti histologického zpracování a hodnocení vzorků. V histologické laboratoři nám pomáhala laborantka Marcela Blažkeová.

Model experimentální autoimunitní uveitidy se nám podařilo zavést s MUDr. Blankou Vlčkovou a MUDr. Petrou Seidler Štangovou s laskavou pomocí telefonických a e-mailových konzultací včetně instruktážního pobytu u prof. Johna Forrester a Dr. Isabely Klaské v Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Velká Británie.

Veškeré pokusy jsme prováděli za finanční podpory grantů IGA MZ ČR NT/14017-3/2013, GA UK č. 910/154250045-295211, SVV UK 266505/2013 a SVV UK 260148/2015.

| | |
|---|-----------|
| OBSAH | |
| Seznam zkratk | 7 |
| Abstrakt a klíčová slova | 9 |
| Abstract and key words | 10 |
| 1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY | 13 |
| 1.1 Uveitida – definice a klasifikace | 13 |
| 1.2 Modely experimentální autoimunitní uveitidy | 15 |
| 1.3 Principy autoimunitních onemocnění | 18 |
| 1.4 Imunologie oka..... | 20 |
| 1.5 Imunitní reakce v průběhu autoimunitní uveitidy a jejich ovlivnění..... | 25 |
| 1.6 Vliv mikrobiomu na imunitní reakce..... | 29 |
| 2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE | 32 |
| 3 MATERIÁL A METODY | 34 |
| 3.1 Experimentální zvířata..... | 34 |
| 3.2 Indukce EAU | 34 |
| 3.3 Zásady úspěšné indukce uveitidy | 35 |
| 3.4 Klinické vyšetření uveitidy a klinické hodnocení EAU | 37 |
| 3.5 Histologické zpracování materiálu a histologické hodnocení EAU | 40 |
| 3.6 Imunohistochemie | 43 |
| 3.6.1 Průkaz CD3+ buněk | 43 |
| 3.6.2 Průkaz F4/80+ buněk..... | 43 |
| 3.7 Průtoková cytometrie..... | 44 |
| 3.8 Léčba antibiotiky | 44 |
| 3.8.1 Zahájení léčby týden před indukcí EAU | 44 |
| 3.8.2 Zahájení léčby v den indukce EAU..... | 45 |
| 3.9 Imunoterapie EAU..... | 45 |
| 3.10 Statistická analýza | 45 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | VÝSLEDKY | 47 |
| 4.1 | Zastoupení CD3+ a F4/80+ buněk v sítnici v průběhu zánětu na řezech barvených imunohistochemickými metodami | 47 |
| 4.1.1 | CD3+ buňky | 47 |
| 4.1.2 | F4/80 + buňky..... | 49 |
| 4.2 | Vliv mikrobiální flóry na průběh zánětu | 52 |
| 4.2.1 | Bezmikrobní myši (skupina A) | 52 |
| 4.2.2 | Myši léčené antibiotiky profylakticky (skupina B) | 54 |
| 4.2.3 | Myši léčené antibiotiky ode dne indukce (skupina C) | 57 |
| 4.2.4 | Imunohistochemie | 58 |
| 4.2.4.1 | Bezmikrobní myši (skupina A) | 58 |
| 4.2.4.2 | Myši léčené antibiotiky profylakticky (skupina B) | 60 |
| 4.2.4.3 | Myši léčené antibiotiky ode dne indukce (skupina C) | 61 |
| 4.2.5 | Průtoková cytometrie krčních a mezenterálních mízních uzlin | 63 |
| 4.3 | Účinek imunomodulátorů na intenzitu zánětu..... | 64 |
| 5 | DISKUZE | 67 |
| 5.1 | Experimentální model EAU | 67 |
| 5.2 | Zánětlivé buňky v sítnici na modelu EAU u myši konvenčních a bezmikrobních | 69 |
| 5.4 | Léčba autoimunitní uveitidy..... | 72 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 75 |
| 7 | LITERATURA | 78 |
| | PŘÍLOHY 1-4..... | 90 |

Seznam zkratek

| | |
|---------------|---|
| ACAID | odchylka imunity v přední komoře oka (anterior chamber associated immune deviation) |
| AIRE | autoimunitní regulační gen (autoimmune regulator) |
| APC | antigen prezentující buňka (antigen presenting cell) |
| CFA | kompletní Freundovo adjuvans |
| CF | cyklofosfamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| EAE | experimentální autoimunitní encefalomyelitida |
| EAU | experimentální autoimunitní uveitida |
| EBV | virus Epstein-Barrové |
| EIU | uveitida indukovaná endotoxinem (endotoxin induced uveitis) |
| GF | bezmikrobní (germ-free) |
| HEL | lysozym slepičího vajíčka (hen egg lysozyme) |
| HHV | lidský herpes virus (human herpes virus) |
| HLA | antigeny MHC u člověka (human leucocyte antigen) |
| IFN | interferon |
| IL-10 | interleukin 10 |
| ILC | lymfoidní buňky vrozené imunity (innate lymphoid cells) |
| ILM | vnitřní limitující membrána (internal limiting membrane) |
| IRBP | vazebný protein v interfotoreceptorové matrix (interphotoreceptor retinoid binding protein) |
| LPS | lipopolysacharid |
| MDSC | myeloidní supresorové buňky (myeloid-derived suppressor cells) |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex) |
| MMF | mykofenolát mofetil |
| α -MSH | alfa-melanocyty stimulující hormon |
| NK | přirození zabíječi (natural killer cell) |
| NOD | neobézní myši s diabetem (non-obese diabetic) |
| PAMP | molekulární struktury spojené s patogeny (pathogen associated molecular pattern) |
| PBS | fosfátový pufr (phosphate buffered saline) |
| PMA | phorbol 12-myristate 13-acetate, aktivátor proteinkinázy C |

| | |
|------|--|
| PMN | polymorfonukleární leukocyt |
| PT | pertusový toxin |
| PTFE | polytetrafluor etylen |
| RPE | retinální pigmentový epitel |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (médium pro buněčné kultury) |
| RS | roztroušená skleróza mozkomíšní |
| SLE | systemový lupus erythematoses |
| Tc | cytotoxický T lymfocyt (T cytotoxic cell) |
| TCR | receptor T lymfocytů (T cell receptor) |
| TGF | transformující růstový faktor (transforming growth factor) |
| Treg | regulační T lymfocyt |
| Th | pomocný T lymfocyt (T helper cell) |
| TNF | tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor) |
| UV | ultrafialové (záření) |
| VIP | vazoaktivní intestinální peptid |

Abstrakt

Úvod: Autoimunitní uveitida postihuje zejména střední věkovou kategorii a přes stále se rozvíjející terapeutické možnosti způsobuje těžké postižení zraku. Vzhledem k široké klinické variabilitě je studium autoimunitní uveitidy v humánní medicíně limitované, proto byly vyvinuty experimentální modely. Cílem naší práce bylo zavést reprodukovatelný model experimentální autoimunitní uveitidy v České republice a dále na tomto modelu sledovat zastoupení CD3+ a F4/80+ buněk v sítnici, zhodnotit vliv mikrobiálního prostředí na intenzitu nitroočního zánětu a testovat terapeutické možnosti.

Materiál a metody: Myším kmene C57BL/6J byl aplikován sítnicový antigen (IRBP 1-20, interphotoreceptor retinoid binding protein) potencovaný kompletním Freundovým adjuvans a pertusovým toxinem, který vyvolá mírnou zadní autoimunitní uveitidu. Myši pocházely z konvenčního a gnotobiotického (bezmikrobního) chovu. Intenzita uveitidy byla hodnocena podle standardizovaných protokolů *in vivo* biomikroskopicky a *post mortem* histologicky na řezech barvených hematoxylin-eozinem. Vzorky tkání byly analyzovány také imunohistochemicky a průtokovou cytometrií. Standardní sledovací doba experimentu byla 35 dnů. Myši s uveitidou z konvenčního chovu byly léčeny perorálními antibiotiky (metronidazol a ciprofloxacin) podávanými profylakticky týden před indukci a ode dne indukce. Také byl testován účinek léčby uveitidy mykofenolát mofetilem, cyklofosfamidem a golimumabem.

Výsledky: V našich laboratorních podmínkách byl zaveden model experimentální autoimunitní uveitidy, byla ověřena jeho stabilita a reprodukovatelnost. Na histologických řezech sítnic zpracovaných na imunohistochemii byla v čase zaznamenána stoupající koncentrace CD3+ a F4/80+ buněk a charakteristické uspořádání zánětlivých ložisek, CD3+ buňky v centru a F4/80+ buňky na jejich periférii. Byla prokázána nižší intenzita zánětu u myší v redukovaném mikrobiálním prostředí: u myší léčených profylakticky perorálními antibiotiky a u bezmikrobních myší. Byl potvrzen účinek mykofenolát mofetilu a cyklofosfamidu v léčbě experimentální autoimunitní uveitidy.

Závěr: Model experimentální autoimunitní uveitidy je vhodný pro studium imunopatogenetických mechanismů i terapeutických možností v základním výzkumu, což může přispět k efektivní léčbě nitroočních zánětů v humánní medicíně.

Klíčová slova: experimentální autoimunitní uveitida, autoimunitní onemocnění, C57BL/6, imunologické privilegium, mikrobiom, CD3+, F4/80+, hemoretinální bariéra, autotolerance, bezmikrobní, gnotobiotický, mykofenolát mofetil

The Mechanisms of Pathogenesis of Experimental Autoimmune Uveitis and Possibilities of Their Regulation

Abstract

Introduction: Uveitis is an intraocular inflammation affecting mostly people of working age. Uveitis is responsible for severe visual impairment despite of expanding new therapeutics. Because of the clinical heterogeneity of uveitis, which limits studies in human medicine, the animal models of uveitis were established. The goal of our project was to implement a reproducible model of experimental autoimmune uveitis in Czech Republic, to observe the frequency of CD3⁺ and F4/80⁺ cells in retina on this model, to assess the influence of microbial environment on intensity of intraocular inflammation and to test the therapeutical possibilities.

Material and methods: The C57BL/6J mice were immunized by retinal antigen (IRBP 1-20, interphotoreceptor retinoid binding protein), enhanced by complete Freund's adjuvant and pertussis toxin and mild posterior autoimmune uveitis was induced. The mice were bred in conventional and germ-free (gnotobiotic) conditions. The uveitis intensity was evaluated *in vivo* biomicroscopically and *post mortem* histologically on hematoxylin eosin stained sections according to the standard protocol. The mouse tissues were analyzed also by immunohistochemistry and by flow cytometry. Each experiment was performed for 35 days. The conventional mice with uveitis were treated with oral antibiotics (metronidazole and ciprofloxacin) starting a week before induction and at the day of induction. Furthermore the effect of mycophenolate mofetil, cyclophosphamide and golimumab was tested on this model.

Results: The model of experimental autoimmune uveitis was established in our laboratory and its stability and the reproducibility was verified. On histological sections after immunohistochemical staining the increasing concentration of CD3⁺ and F4/80⁺ cells in time was observed as well as the characteristic arrangement of retinal infiltrates with CD3⁺ cells in the center of the infiltrates and F4/80⁺ cells at its periphery. The lower inflammation intensity was proved in reduced microbial environment: in mice treated prophylactically by antibiotics and in germ-free mice. The effect of mycophenolate mofetil and cyclophosphamide was confirmed in treatment of experimental autoimmune uveitis.

Conclusion: The model of experimental autoimmune uveitis is an ideal tool to study the immunopathological mechanisms and therapeutical possibilities in basic research. This can contribute to effective treatment of intraocular inflammation in human medicine.

Key words: experimental autoimmune uveitis, autoimmune disease, C57BL/6, immune privilege, microbiome, CD3+, F4/80+, hematoretinal barrier, self-tolerance, germ-free, gnotobiotic, mycophenolate mofetil

Kapitola 1

ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Uveitida – definice a klasifikace

Uveitida je nespecifický název pro **nitrooční zánět duhovky, řasnatého (ciliárního) tělíska a/nebo cévnatky**. Uveitida je charakterizována typickými známkami zánětu, tj. zánětlivým exsudátem a buňkami v přední komoře a/nebo ve sklivci a/nebo v choroidee a v přilehlých tkáních.

Uveitida postihuje především střední věkovou kategorii, prevalence je 40 případů na 100 000 obyvatel [Kuchynka a kol., 2007] a představuje desetiprocentní podíl na slepotě v rozvinutých zemích [Suttorp-Schulten a Rothova, 1996; Durrani et al., 2004].

Pracovní skupina pro standardizaci názvosloví uveitid (Standardization of Uveitis Nomenclature – SUN) dělí uveitidy podle několika **kritérií** [Jabs et al., 2005].

Podle anatomických projevů:

- přední
- intermediální
- zadní
- panuveitida

Podle příčiny:

- infekční
- neinfekční
- idiopatická
- maskující syndrom

Podle průběhu:

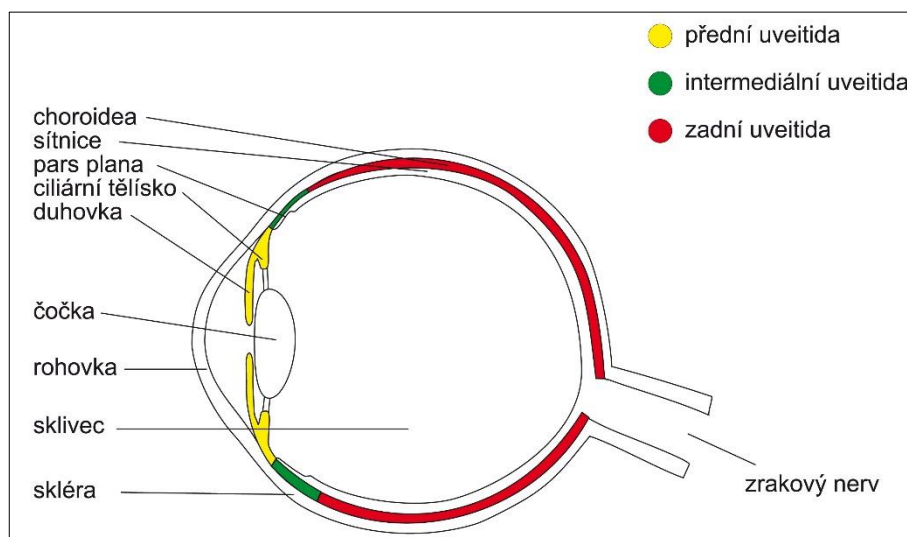
- akutní
- chronická
- recidivující

Přední uveitida se vyskytuje 4krát častěji než zadní a postihuje struktury předního segmentu - duhovku a řasnaté těleso (iritida, iridocyklitida; obrázek 1). Projevy zánětu jsou patrné především v přední komoře.

Intermediální uveitida představuje zánětlivé poškození sklivce (vitritida), zadní části řasnatého tělíska a periferní sítnice.

Zadní uveitida postihuje především zadní struktury oka. Projevuje se buněčnou infiltrací sklivce, zánětem retinálních cév (vaskulitidou), zánětlivou infiltrací sítnice a/nebo cévnatky (retinitidou, retinochoroiditidou, choroiditidou).

Panuveitida zahrnuje nitrooční postižení předního i zadního segmentu oka zánětem.



Obrázek 1- Struktury oka na schématu příčného řezu a anatomické dělení uveitid

Příčinou uveitidy mohou být infekce (20 %), autoimunitní mechanismy (30 %) nebo úraz. Téměř u poloviny případů však etiologii nezjistíme. Přibližně u 25 % pacientů se uveitida pojí se systémovým onemocněním typu sarkoidózy, ankylozující spondylitidy, roztroušené mozkomíšní sklerózy (RS), systémového lupus erytematodes (SLE), granulomatózy s polyangiitidou (dříve označovaná jako Wegenerova granulomatóza) apod. Maskující syndromy jsou skupinou benigních i maligních chorob projevujících se pod klinickým obrazem uveitidy.

Akutní uveitida trvá méně než 3 měsíce a začíná náhle. Chronická uveitida může probíhat měsíce i roky. O recidivující uveitidě hovoříme při opakovaných epizodách zánětu, které jsou odděleny minimálně tříměsíčním obdobím remise bez léčby [Říhová a kol., 2009].

Naše práce se věnuje problematice **chronické zadní uveitidy autoimunitní etiologie** na myším modelu **experimentální autoimunitní uveitidy (EAU)**.

1.2 Modely experimentální autoimunitní uveitidy

Vzhledem k tomu, že autoimunitní uveitida u lidí je relativně vzácné a heterogenní onemocnění, byly před 40 lety vyvinuty zvířecí modely ke studiu patogeneze uveitidy, jejich genetických souvislostí i terapeutických možností.

První model uveitidy u potkanů [Lalive, 1968] využíval aplikaci Freundova adjuvans obsahujícího mykobakteria a později i endotoxinu [Forrester et al., 1980]. Od té doby byl vyvinut model autoimunitní uveitidy u morčat, koní a primátů imunizací jedním ze sítnicových antigenů – arrestinem neboli S-antigenem v kompletním Freundově adjuvans [Wacker a Kalsow, 1973; Hirose et al., 1989]. Jeho aplikace experimentálnímu zvířeti vyvolává onemocnění s klinickým obrazem velmi podobným uveitidě u lidí. Vysoké koncentrace T lymfocytů specifických proti retinálním antigenům, zejména proti S-antigenu byly zjištěny i u pacientů s uveitidou [Caspi, 2008]. U běžně používaných kmenů myši však S-antigen zánětlivé oční onemocnění nevyvolává. Až po objevu intraretinálního vazebného peptidu (IRBP) byl vyvinut experimentální model autoimunitní uveitidy u myši [Caspi et al., 1988]. Od té doby vznikly četné varianty prvního základního myšského modelu, který spočívá v subkutánní aplikaci antigenu (IRBP).

Modely EAU mohou být rozděleny na dvě skupiny: uveitidy indukované imunizací a uveitidy spontánní.

Modely EAU indukované antigeny využívají retinálních antigenů k imunizaci zvířat. K vyvolání uveitidy je nezbytné přidat bakteriální adjuvans pertusový toxin (PT) a kompletní Freundovo adjuvans (CFA) obsahující teplem usmrcené mykobakterie. Buňky nespecifické imunity (monocyty, dendritické buňky, neutrofilů a $\gamma\delta$ T lymfocyty) rozpoznají mikrobiální receptory, což vyvolá prozánětlivý stav vedoucí k aktivaci mechanismů specifické imunity [Caspi, 2010]. V našich experimentech byla EAU indukována pomocí IRBP 1-20 humánního původu. Protein IRBP se nachází v sítnici v interfotoreceptorové matrix, která slouží k transportu derivátů vitamínu A mezi fotoreceptory a retinálním pigmentovým epitelem (RPE). Strukturu proteinu IRBP tvoří čtyři evolučně staré domény, o kterých se předpokládá, že vznikly genovou duplikací [Agarwal et al., 2012].

Mezi modely indukované EAU patří kromě indukce sítnicovými peptidy (IRBP nebo arrestinem) také adoptivní přenos T lymfocytů (Th1 nebo Th17) z imunizovaných dárců (adoptivní transfer) a EAU indukovaná injekcí dendritických buněk, které *in vitro* zrály v přítomnosti antigenu. Indukovaný model EAU představuje také imunizace adoptivním

transferem u HLA-DR3 transgenních myši, tzv. „humanizovaná“ forma EAU. U modelů imunizovaných adoptivním transportem převažuje specifický typ imunity.

Model spontánní EAU vzniká u geneticky manipulovaných myši, například transgenní „knockout“ myši, kterým chybí gen pro autoimunitní regulátor (AIRE) [Caspi, 2010]. AIRE je transkripční faktor kontrolující ektopickou expresi tkáňových antigenů v thymu, včetně několika retinálních antigenů. Ztráta exprese retinálních antigenů v thymu brání negativní selekci T lymfocytů namířených proti retinálním antigenům, které tak putují do periferie a způsobují u myši spontánní EAU [Caspi, 2006]. Další typ spontánní uveitidy představují transgenní myši exprimující retinální neo-autoantigen (HEL, hen egg lysozyme; lysozym slepičího vajíčka) [Lambe et al., 2007].

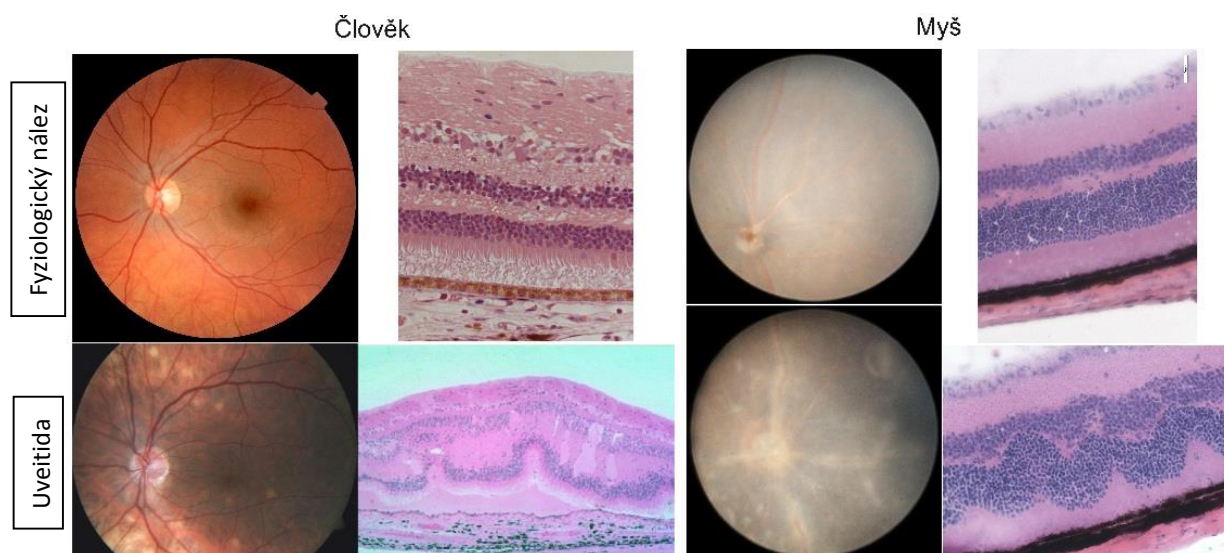
Podle typu aplikovaného antigenu a podle typu inbredního kmene vzniká u potkanů a myši různý typ uveitidy. Některé modely EAU mají **akutní těžký zánět** v předním i zadním segmentu oka a mohou sloužit jako model humánní panuveitidy. Příkladem je EAU u potkanů indukovaná arrestinem [de Kozak et al., 1981] nebo u myši kmene B10.RIII indukovaná pomocí IRBP 161-180 [Jiang et al., 1999; Silver et al., 1999]. Zatímco u jiných modelů EAU se vyvolá mírná **chronická uveitida** postihující zadní segment oka, například u myši kmene C57BL/6 je EAU indukovaná pomocí IRBP 1-20 [Avichezer et al., 2000; Broderick et al., 2002] nebo adoptivním transferem T lymfocytů [Caspi et al., 1986; Hu et al., 1990; Shao et al., 2006].

Pro studium přední uveitidy je nejběžnější model uveitidy indukované endotoxinem (EIU, endotoxin induced uveitis).

Uveitidu lze vyvolat pouze u některých kmenů myši. **Kmeny myši** s haplotypem H-2 MHC jsou citlivé k vyvolání EAU, což připomíná silnou asociaci uveitidy s HLA u lidí. Kmeny myši náchylné k EAU mají haplotypy H-2^b (C57BL/10 a C57BL/6), H-2^k (B10.BR) a H-2^r (B10.RIII). Hierarchie citlivosti k EAU indukované retinálním antigenem IRBP je B10.RIII > B10.BR > C57BL [Caspi et al., 1992]. MHC je zodpovědný pouze za část genetické predispozice k uveitidě. Na penetranci a intenzitu onemocnění mají zásadní vliv další geny. Účinky těchto genů jsou komplexní a zahrnují obecně všechny aspekty imunitní odpovědi včetně hormonální odpovědi na stres nebo úroveň exprese ektopických tkáňových antigenů v thymu. Patogeneze uveitidy je výsledkem spolupůsobení různých genetických vlivů a vlivů zevního prostředí [Caspi et al., 1992].

Experimentální autoimunitní uveitida u myši představuje reprodukovatelný model EAU, který otevírá další možnosti v oblasti výzkumu zadní uveitidy autoimunitní etiologie. Uveitida indukovaná IRBP antigenem u myši kmene C57BL/6 je mírná a chronická a blízce připomíná

autoimunitní uveitidu u lidí s vitritidou, retinitidou, vaskulitidou a dalšími znaky (obrázek 2) [Forrester et al., 1990, Forrester et al., 1992]. Výhodou u tohoto modelu je relativně dlouhá doba aktivity zánětu od 21. do 35. dne. Minimální či žádné postižení předního segmentu umožňuje při biomikroskopii dobrou vyšetřitelnost sítnice i při vysoké aktivitě zánětu.



Obrázek 2 - Srovnání klinického a histologického obrazu zadní autoimunitní uveitidy u člověka a u myši kmene C57BL/6, obrázky histologie humánní sítnice převzaty z publikace Caspi, 2010

1.3 Principy autoimunitních onemocnění

Autoimunitní onemocnění mohou být rozdělena na systémová a orgánově specifická. Jedná se vždy o celkovou poruchu mechanismů tolerance. Někdy dochází k manifestaci více autoimunitních chorob u jednoho pacienta. Celková incidence autoimunitních onemocnění je kolem 5 % [Hořejší et al., 2013].

Autoimunitní onemocnění představuje poruchu tolerance imunitního systému vůči buňkám vlastní tkáně. Za fyziologických podmínek lymfocyty nereagují na antigeny vlastních buněk. **Centrální tolerance** na autoantigeny je ustanovena u nezralých lymfocytů, které se s antigenem setkají v centrálních lymfatických orgánech, v thymu a v kostní dřeni. Zralé lymfocyty se setkají s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech nebo v periferní tkáni (**periferní tolerance**) [Abbas et al., 2014].

Pro T lymfocyty, které hrají hlavní roli u zadní uveitidy autoimunitní etiologie, se centrální tolerance ustanovuje v thymu nebo v kostní dřeni pozitivní a negativní selekcí (klonální delece) autoreaktivních lymfocytů. Při vzniku autoimunitních onemocnění se předpokládá zejména selhání periferní tolerance, která probíhá v periferních tkáních (v oku) nebo v regionálních uzlinách. Periferní tolerance je udržována několika způsoby:

- delece – eliminace autoreaktivních klonů, které hynou apoptózou
- anergie – funkční útlum lymfocytů v důsledku chybění kostimulačního signálu
- ignorance – neschopnost lymfocytů rozpoznat autoantigen, jelikož je autoantigen exprimován na vlastní tkáni v podprahovém množství
- suprese – potlačení autoreaktivních lymfocytů jinými imunokompetentními buňkami a jejich produkty (zejména T regulačními lymfocyty)

K prolomení mechanismů autoimunity je obvykle nutné působení několika faktorů, a to kombinací faktorů vnitřních (genetických) a faktorů zevního prostředí. Multifaktoriální charakter autoimunitních onemocnění dokazují studie incidence u jednovaječných dvojčat nebo výskyt autoimunit jen u části inbredních kmenů experimentálních zvířat v závislosti na vnějších podmínkách [Hořejší et al., 2013]. Z vnitřních faktorů podílejících se na autoimunitě jsou to asociace s glykoproteiny MHC (HLA), poruchy genů kódujících cytokiny a genů regulujících apoptózu (Fas, FasL, Bcl-2, CTLA-4, Bim), polymorfismy genů kódujících T receptor lymfocytů (TCR) a těžké řetězce imunoglobulinů a také hormonální faktory (vyšší incidence autoimunitních onemocnění u žen). Zevní faktory vzniku autoimunit zahrnují infekce, stres, léky a jiné chemikálie a UV záření [Hořejší et al., 2013].

Uveitidy u lidí jsou často **asociovány s HLA geny**. Obzvláště silná je asociace u sympatické oftalmie a Vogt-Koyanagi-Harada syndromu (HLA DR4 a HLA DQ4) a „birdshot“ retinohoroidopatie (HLA A29). Slabší asociace s HLA geny je u Behçetovy choroby (HLA B51) nebo u přední uveitidy provázející ankylózní spondylitidu (HLA B27). Protože HLA molekuly II. třídy se účastní prezentace antigenu, předpokládá se, že asociace s HLA slouží k rozpoznávání určitých antigenů a epitopů [Caspi, 2010].

1.4 Imunologie oka

V oku neprobíhají imunologické reakce jako ve většině ostatních orgánů. Oko patří spolu s mozkem a varlaty mezi **imunoprivilegované tkáně**. Je tak zajištěna homeostáza chránící normální funkce v tkáních s limitovanou možností regenerace. Tato ochrana má však své nevýhody. Při silné imunitní odpovědi a prolomení tohoto mechanismu je takový orgán více ohrožen destrukcí, protože jeho přirozené ochranné mechanismy jsou slabé oproti plně imunokompetentní tkáni, která rychle odstraní cizí antigen a obnoví svou integritu [Caspi, 2010].

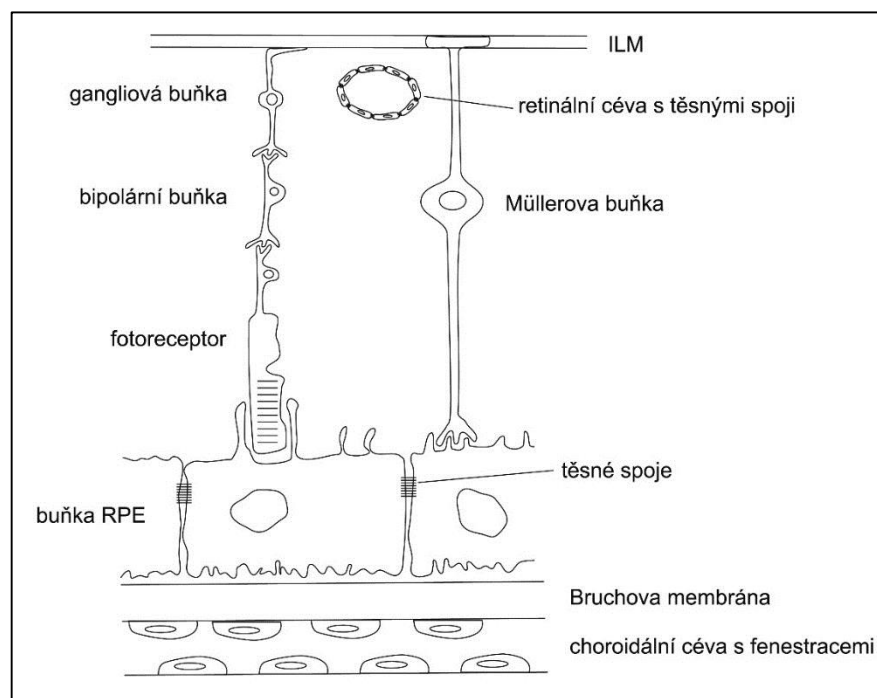
Mechanismy imunologického privilegia fungují na několika úrovních a tvoří je [Forrester a Xu, 2012]:

- intraokulární imunomodulátory (ACAID; anterior chamber associated immune deviation)
- hematookulární bariéra
- indukce T regulačních lymfocytů (Treg)
- nepřítomnost lymfatických cév

Přední komora oční obsahuje komorovou tekutinu, u které byly prokázány imunosupresivní účinky. V přední komoře jsou přítomny protizánětlivé cytokiny (TGF- β , IL-10) a protizánětlivé faktory, např. α -melanocyty stimulující hormon (α -MSH), vasoaktivní intestinální peptid (VIP), somatostatin aj. ACAID je odchylka imunity v přední oční komoře, kdy při aplikaci antigenu do přední oční komory je potlačena systémová buněčná imunitní reakce proti tomuto antigenu [Strelein a Cousins, 1990]. Na povrchu cytotoxického lymfocytu (Tc) se nachází protein Fas-ligand (FasL), který se váže na apoptotický receptor Fas (CD95) přítomný na povrchu buněk rohovky, duhovky, ciliárního tělíska a RPE. Dochází k apoptotické smrti Tc lymfocytu, což omezuje v prostředí oka imunitní reakce založené na Tc lymfocytech [Hořejší a kol., 2013].

Nitrooční kompartment je oddělený od krevního a lymfatického oběhu hematookulární bariérou. **Hematookulární bariéra** má 2 složky:

- hematovitreální bariéru – těsné spoje epitelu ciliárního tělíska a těsné spoje endotelových buněk duhovkových cév
- hematoretinální bariéru (obrázek 3) – těsné spoje mezi buňkami RPE a endotelovými buňkami sítnicových cév



Obrázek 3 - Schéma hemoretinální bariéry

Hemoretinální bariéra je zajištěna těsnými spoji mezi endotelovými buňkami cév a těsnými spoji mezi buňkami RPE. ILM – vnitřní limitující membrána (internal limiting membrane).

Sítňicové cévy zásobují vnitřní vrstvy sítnice (gangliové a bipolární buňky). Zevní vrstvy sítnice jsou zásobovány živinami transportovanými z krve z fenestrováných propustných choroidálních cév přes buňky RPE. Buňky RPE regulují obousměrný transport tekutin, živin a odpadních látek mezi zevními vrstvami sítnice (fotoreceptory) a mezi vysokotlakým velkoobjemovým choroidálním krevním řečištěm.

Porucha hemoretinální bariéry tedy může nastat na dvou úrovních, v sítňicových cévách nebo ve vrstvě buněk RPE [Forrester a Xu, 2012].

Imunologické privilegium nitroočního prostředí, resp. autotolerance je zajištěna také prostřednictvím **T regulačních lymfocytů**. Treg lymfocyty vznikají diferenciací z CD4+ lymfocytů po rozpoznání autoantigenů. Pocházejí z větší části z thymu nebo z periferních lymfatických orgánů. Treg lymfocyty jsou produkovány v důsledku exprese transkripčního faktoru Foxp3, který vzniká v prostředí cytokinu TGF- β a IL-2. Treg lymfocyty inhibují aktivaci naivních T lymfocytů a jejich diferenciaci v efektorové buňky [Abbas et al., 2014].

Negativní důsledek imunologického privilegia je možné demonstrovat u lidí na příkladu sympatické oftalmie, zrak ohrožujícího autoimunitního onemocnění. Sympatická oftalmie je akutní nitrooční zánět vznikající na základě penetrujícího očního poranění nebo nitrooční operace jednoho oka následovaný týdny, měsíce i roky destruktivním zánětem druhého oka. Předpokládá se autoimunizace očními antigeny uvolněnými z poraněného oka, které docestují do drénující uzliny a aktivují autoreaktivní T lymfocyty. U pacientů se sympatickou oftalmií byla potvrzena přítomnost očních antigenů - S-antigenu a proteinu asociovaného s melaninem [Gery a Strelein, 1994].

Pozitivní důsledek imunologického privilegia je oceňován u vynikajících výsledků transplantace rohovky. Transplantované rohovky jsou často funkční celoživotně bez nutnosti imunosuprese.

Rezidentní buňky v oku, které se účastní imunitní reakce, jsou endotelové buňky cév, RPE, endotelové buňky rohovky a buňky glie v sítnici (Müllerovy buňky a mikroglie). V sítnici za fyziologických podmínek nejsou imunokompetentní buňky přítomny, jsou zastoupeny buňkami pigmentového epitelu a buňkami mikroglie. Buňky nespecifické imunity (rezidentní tkáňové makrofágy a dendritické buňky) jsou fyziologicky přítomny v uvee, v rohovce, spojivce a periokulární fascii [Forrester a Xu, 2012]. Odpovídají na zánět změnou povrchových receptorů MHC I. a II. třídy a adhezivních molekul. Adhezivní molekuly umožní migraci leukocytů do místa zánětu. Předpokládá se, že rezidentní buňky mají spíše imunosupresivní než imunostimulační účinky [Roberge et al., 1988; Caspi et al., 1987; Hooper et al., 1991].

Makrofágy se za fyziologických podmínek nacházejí v oku v uveální tkáni. Zajišťují ochranu tkáně fagocytózou tkáňových odpadních látek, naopak dysregulace při patologickém stavu vede k jejich aktivaci. Makrofágy jsou antigen prezentující buňky nesoucí MHC II. třídy pro T lymfocyty. Makrofágy vznikly v kostní dřeni a jako monocyty cirkulují v krevním oběhu a vycestují do tkáně [Chan a Li, 1998]. Makrofágy se stávají funkčními až po aktivaci signály od Th lymfocytů (INF- γ , TNF- β) a mikrobiálními produkty, např. endotoxinem. Aktivované makrofágy produkují velké množství cytokinů a růstových faktorů (IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- β , TGF- β , defensiny, oxid dusnatý, aj.), které modulují imunitní reakci. Makrofágy s fenotypem 1 (**zánětlivé**) jsou aktivované klasickou cestou pomocí LPS a IFN- γ a produkují vysoké hladiny prozánětlivého IL-12. Makrofágy s fenotypem 2 (**hojivé**) podporují reparaci tkání a neovaskularizaci jsou aktivované alternativní cestou a produkují vysoké hladiny protizánětlivého IL-10 a TGF- β . Třetí skupinou aktivovaných makrofágů jsou **regulační**

makrofágy s imunosupresivní rolí produkující protizánětlivý IL-10. Regulační makrofágy jsou aktivovány produkcí glukokortikoidů nebo prostaglandinů [Forrester et al., 2015; Caspi, 2013].

Mikroglie jsou specializované makrofágy v sítnici a centrálním nervovém systému. Funkcí mikroglie je odstraňovat poškozené a odumřelé buňky ze sítnice [Gayathri et al., 2014]. Mikroglie jsou pro vidění významné během vývoje, při infekci, zranění a v procesu reparace a regenerace. Pravděpodobně vznikají z prekursorů žloutkového vřáčku v časném období vývoje, v dospělosti jsou doplňovány z monocytů kosní dřevě. Mikroglie jsou výrazně rozvětvené buňky, imunologicky představují klidové makrofágy. V sítnici mají těla buněk na rozhraní vrstvy nervových vláken a gangliových buněk, ve vnitřní nukleární vrstvě a v zevní plexiformní vrstvě. Výběžky mikroglie se neustále pohybují a jejich síť prostupuje celou vrstvou sítnice. Po poranění sítnice jsou aktivovány a chovají se jako toulavé fagocytující buňky. Aktivované mikroglie produkují cytokiny a chemokiny, ale nemají funkci antigen prezentujících buněk [Forrester et al., 2015]. Aktivace mikroglie je zásadní při patologii věkem podmíněné makulární degenerace, Alzheimerově chorobě nebo RS [Madeira et al., 2015].

Dendritické buňky (DC) jsou hlavní antigen prezentující buňky (APC) naivním T lymfocytům. DC jsou hlavními buňkami spojujícími nespecifickou a specifickou imunitní odpověď. Rezidentní, nemigrující DC se nacházejí v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, lymfatické uzliny). Migrující DC vznikají v kostní dřevě a migrují do tkáně (do uvey), kde jako sentinelové buňky hlídají patogeny a další nebezpečné signály a transportují antigen do sekundárních lymfatických tkání, kde aktivují specifickou imunitní reakci (T a B lymfocyty). Jejich hlavní funkcí je prezentace antigenu T lymfocytům, další funkcí je udržovat homeostázu a toleranci indukci Treg lymfocytů [Forrester et al., 2015; Jiang et al., 1999].

Dendritické buňky rozeznáváme myeloidní (stimulují Th1 lymfocyty), lymfoidní (aktivují Th2 lymfocyty), folikulární (podporují diferenciaci B lymfocytů) a plazmacytoidní (propojují nespecifickou a specifickou imunitní odpověď) [Abbas et al., 2014].

Na rozvoji EAU se podílejí mechanismy **specifické i nespecifické imunity**. Buňky nespecifické imunity, například $\gamma\delta$ T lymfocyty, NK buňky a monocyty/makrofágy jsou důležité nejen jako cílové efektorové buňky zánětlivého poškození tkáně, ale také jako aktivní účastníci formující odpověď efektorových T lymfocytů, která vede k uveitidě. Hlavními buňkami spojujícími nespecifickou a specifickou imunitní odpověď jsou DC prezentující antigen T lymfocytům.

Druhou významnou skupinou buněk propojující specifickou a nespecifickou imunitu jsou „**innate lymphoid cells**“ (ILC). ILC jsou skupinou lymfoidních buněk, které nesou charakteristiky lymfocytů, neexprimují ale žádný receptor (ani $\alpha\beta$ ani $\gamma\delta$), ani u nich nedochází

ke klonální selekci a expanzi. ILC jsou protipólem T lymfocytů v nespecifické imunitě. Reagují rychle na signály z poškozených a infikovaných buněk. Produkují stejné cytokiny jako T lymfocyty (ILC1 produkuje $\text{INF}\gamma$ jako Th1 lymfocyty; ILC2 produkuje IL-4 jako Th2 lymfocyty; ILC3 produkuje IL-22/IL-17 jako Th17 lymfocyty). Podskupinou ILC1 jsou NK buňky. Produkované cytokiny ovlivňují myeloidní buňky a regulují aktivitu rezidentních tkáňových dendritických buněk, které jsou zásadní v komunikaci mezi ILC a T lymfocyty. ILC aktivují rezidentní tkáňové dendritické buňky k migraci do regionálních lymfatických uzlin, kde se odehrává specifická reakce s T lymfocyty [Eberl et al., 2015; Forrester et al., 2015].

U chronického zánětu (a nádoru) jsou v tkáni přítomné myeloidní supresorové buňky (**MDSC**, myeloid-derived suppressor cells), což jsou buňky inhibující proliferaci a aktivaci leukocytů (T lymfocytů, NK buněk, makrofágů, dendritických buněk). MDSC akcelerují angiogenezi a u nádorů progresi. U chronických onemocnění jsou myeloidní buňky kostní dřeně kromě obvyklé diferenciaci v dendritické buňky, makrofágy a neutrofile v nadprodukcii diferencovány v MDSC jako zpětnovazebný mechanismus kontroly zánětu [Tu et al., 2012].

Zánětlivé buňky se do sítnice dostávají v důsledku reakce na retinální antigen. V současnosti je u zvířat známo nejméně 10 uveogenních antigenů, například S-antigen (retinal arrestin), IRBP, rhodopsin, opsin, phosducin, recoverin, Rpe65 (RPE), melanin (duhovka, choroidea), TRP1 a TRP2 (choroidea), čočkové proteiny a mnoho dalších. Relativní nedostupnost retinálních antigenů v oku za hematookulární bariérou neumožňuje vytvořit periferní toleranci, proto jsou T lymfocyty aktivovány náhodným setkáním s antigenem z oka nebo prostřednictvím mikrobiální mimikry [Caspi, 2014].

1.5 Imunitní reakce v průběhu autoimunitní uveitidy a jejich ovlivnění

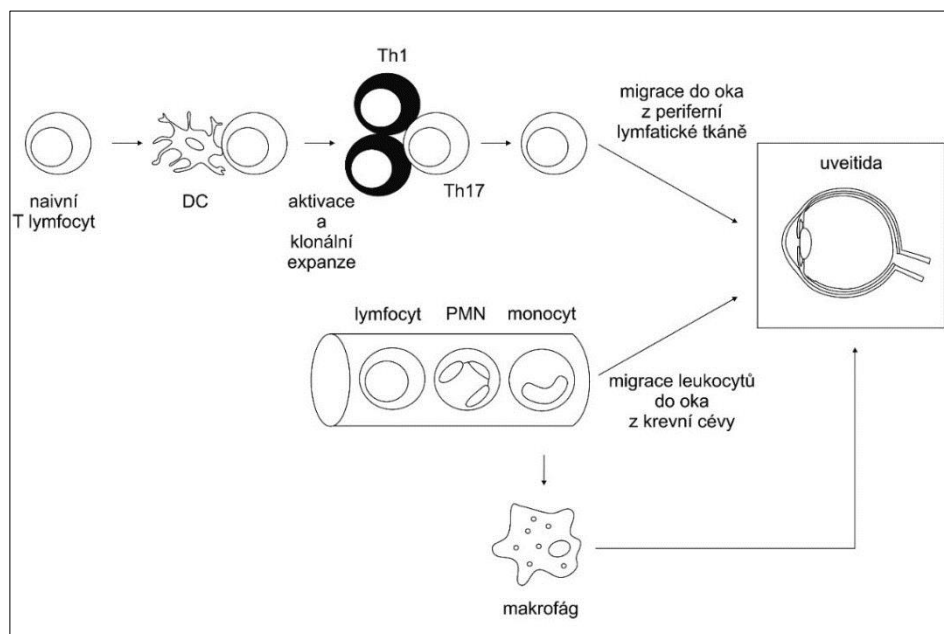
Ochrana očního povrchu a jeho antibakteriální aktivita je udržována látkami obsaženými v slzném filmu, muciny a antibakteriálními substancemi produkovanými imunitními buňkami a buňkami očního povrchu. Vnitřní kompartment oka představuje sterilní prostředí oddělené od imunitního systému vysoce efektivní hematookulární bariérou, která brání volnému průchodu buněk a velkých molekul do oka a z oka. Limitovaný přístup imunitních buněk do oka tak brání ustanovení periferní tolerance k tkáňově specifickým antigenům lokalizovaným v oku a netolerantní (autoreaktivní) T lymfocyty přetrvávají v cirkulaci. Pokud vznikne aktivační stimul, mikrobiální (mimikry) nebo endogenní (např. trauma), mohou být tyto autoreaktivní T lymfocyty aktivovány k autoimunitní reakci proti oku. Hematookulární bariéru mohou prostoupit pouze aktivované T lymfocyty [Xu et al., 2007].

Jak je možné, že oko, které je důkladně chráněno před minimálním poškozením, může být atakováno autoreaktivními lymfocyty? Oko je schopné konvertovat aktivované autoreaktivní T lymfocyty na Treg lymfocyty nebo je deaktivovat. Nicméně autoreaktivní T lymfocyty, které byly aktivovány před vstupem do oka, již nemůže oko ovlivnit. Takové T lymfocyty odolávají inhibičním faktorům v oku a způsobují zánět [Zhou et al., 2012]. Další negativní důsledek imunologického privilegia oka je protekce nitroočních tumorů.

Autoimunitní uveitida je buněčná T lymfocyty zprostředkovaná specifická imunitní reakce. Na destrukci tkáně se účastní také mechanismy nespecifické imunity, zejména prostřednictvím makrofágů (obrázek 4).

Při nitroočním zánětu autoimunitní povahy jsou nejdůležitějšími buňkami zajišťujícími specifickou reakci organismu proti antigennímu podnětu aktivované T lymfocyty. Ve formě **T cytotoxických lymfocytů** (CD8+, Tc) přímo usmrcují buňky nesoucí rozpoznáný antigen. T **pomocné lymfocyty** (CD4+, Th) stimulují jiné buňky imunitního systému (např. makrofágy) k destrukci tkáně, dále regulují průběh imunitní odpovědi, zajišťují interakce mezi buňkami imunitního systému produkcí cytokinů a zajišťují paměťovou reakci organismu [Říhová a kol., 2009]. Podle produkce cytokinů se rozlišuje více typů Th (CD4+) lymfocytů (tabulka 1). Předpokládá se, že za rozvoj EAU jsou zodpovědné **Th1 a Th17 lymfocyty**, naopak **Th2 a Treg lymfocyty** chrání proti EAU [Jiang et al., 1999; Forrester et al., 2015]. Poškození tkání zánětem je způsobeno Tc a Th1 lymfocyty, jejich cytokinovými produkty a aktivací makrofágů [Hořejší et al., 2013]. Th1 lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny IL-2, TNF- β a IFN- γ . Th17 lymfocyty produkují IL-17, který přitahuje do místa zánětu neutrofile, ale také monocyty

[Abbas et al., 2014]. Podle klasifikace zavedené Coombsem a Gellem se jedná o IV. typ imunopatologické reakce buněčně zprostředkované.



Obrázek 4 - Mechanismus autoimunitní uveitidy

Autoreaktivní T lymfocyty specifické proti retinálním antigenům unikly mechanismům centrální a zároveň periferní tolerance. Tyto T lymfocyty se proměnily díky aktivaci antigen prezentující buňky (zejména dendritické buňky) v aktivované autoreaktivní T lymfocyty. Po klonální expanzi v lymfatické uzlině migrují do oka přes porušenou hematookulární bariéru a přitahují zánětlivé leukocyty (lymfocyty, polymorfonukleární leukocyty (PMN) a monocyty) z krevního oběhu. Výsledný zánět vede k tkáňovému poškození a uvolnění očních antigenů a spouští regulační mechanismy, které v oku vedou k manifestaci uveitidy.

Tabulka 1 - Druhy CD4+ lymfocytů u autoimunitních onemocnění

| Typ CD4+ lymfocytů | Hlavní produkované cytokiny | Hlavní funkce ve specifické imunitní odpovědi |
|-----------------------|-------------------------------|--|
| Th1 lymfocyty | IL-2 TNF-β IFN-γ | - prozánětlivé účinky klasickou aktivací makrofágů - stimulují B lymfocyty k produkci protilátek |
| Th2 lymfocyty | IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 | - protizánětlivý efekt, hojení a fibróza v tkáni alternativní aktivací makrofágů - stimulují B lymfocyty k produkci protilátek |
| Th17 lymfocyty | IL-17A IL-17F IL-22 | - široké spektrum prozánětlivých účinků včetně chemotaxe neutrofilů a monocytů do místa zánětu |
| T regulační lymfocyty | IL-10 TGF-β IL-35 | - inhibice aktivace naivních T lymfocytů a jejich diferenciaci v efektorové buňky |

Znalosti základních mechanismů patogeneze uveitidy umožňují cíleně využívat imunoterapii. Mnoho nových biologik zavedených v praxi bylo vyvinuto nebo ověřováno na zvířecích modelech autoimunitních nebo zánětlivých onemocnění, včetně EAU. Projekt mapování genomu (Human, Mouse, Rat Genome Project) odhalil, že 99 % myších genů má obdobné sekvence jako u lidí a 75-80 % jsou identické ekvivalenty. Dále se zjistilo, že téměř všechny geny asociované s chorobami u lidí jsou u myši a potkanů ortologní. Obrovská genetická podobnost mezi člověkem a laboratorním hlodavcem umožňuje používání zvířecích modelů, které mohou poskytnout cenné informace na experimentální i klinické úrovni [Caspi, 2014].

Imunosupresivní a imunomodulační terapie se u autoimunitní uveitidy zaměřuje na ovlivnění T lymfocytů, zánětlivých cytokinů a obecně proliferujících buněk. Léčba namířená proti T lymfocytům využívá monoklonální protilátky proti **IL-2** receptoru nebo látky zasahující do signální dráhy IL-2, např. cyklosporin A, tacrolimus a mykofenolát mofetil [Caspi, 2010]. Velká část léků patří do skupiny **anti-TNF-α**. TNF-α je hlavním mediátorem imunitní reakce zprostředkované T lymfocyty. Protilátky nebo adhezivní molekuly (fúzní proteiny jejich receptorů se váží k lidskému imunoglobulinu) rozpoznávají TNF-α v solubilní formě nebo vázaný na membrány a neutralizují jeho aktivitu [Forrester et al., 2015]. Současná imunoterapie

používaná v klinické praxi je vzhledem k jejím nespecifickým účinkům často nedostatečně efektivní a bývá provázena závažnými nežádoucími účinky.

Silný imunosupresivní účinek má cyklofosfamid (CF), což je alkylační cytostatikum, které inhibuje replikaci DNA a eliminuje nejen proliferující, ale také některé klidové lymfoidní buňky. U lidí je imunosupresivní účinek CF již dlouho znám. Vzhledem k závažným nežádoucím účinkům je CF vyhrazen pro pacienty, u kterých selhal jiný imunomodulační režim, nebo jako léčba první volby u život ohrožujících onemocnění [Suelves et al., 2013; Khan et al., 2013].

Nejistý účinek v léčbě autoimunitní uveitidy má mykofenolát mofetil (MMF). MMF je antimetabolit, který reverzibilně inhibuje syntézu purinu nezbytného pro růst B a T lymfocytů. Úspěchy léčby MMF u neinfekční uveitidy u lidí jsou publikovány v několika kazuistických sděleních: Siepmann [2006], Teoh et al. [2008], Doycheva et al. [2011] nebo Daniel et al. [2010]. Jeho účinek však není tak výrazný jako při léčbě onemocnění rohovky [Zierhut et al., 2005]. Jako úspěšná se v literatuře uvádí i malá efektivita léčby.

Lékem ze skupiny anti-TNF- α je golimumab, který má výhodu, oproti jiným preparátům, aplikaci subkutánně jednou měsíčně. Slibné výsledky u lidí jsou popsány v sérii kazuistik u pacientů s těžkou autoimunitní uveitidou [Miserocchi et al., 2013].

Efektivní léčba autoimunitní uveitidy by ideálně inhibovala složku specifické imunity (T a B lymfocyty), složku nespecifické imunity (monocyty-makrofágy, neutrofilny) a cytokiny, které obě složky produkují. Nicméně léčba zaměřená na produkty více skupin imunokompetentních buněk, jako například adhezivní molekuly, cytokiny a jejich receptory, může mít nežádoucí následky v inhibici antimikrobiální a protinádorové obranyschopnosti.

V terapii uveitid je odklon od nespecifické imunosuprese směrem k cílené biologické léčbě. Biologická léčba je nepřesný pojem, představuje postupy založené na monoklonálních protilátkách a proteinech působících jako aktivátory nebo inhibitory specifických molekul a procesů v imunitních, ale i jiných fyziologických dějích. Monoklonální protilátky se používají chimérické nebo humanizované. Používají se jako imunosupresiva, protizánětlivé léky, antiinfekční prostředky, ale i v terapii nádorových onemocnění [Hořejší a kol., 2013].

1.6 Vliv mikrobiomu na imunitní reakce

Střevní mikroflóra je považována za důležitý regulační prvek pro udržení imunologické homeostázy a autoimunity. V celé řadě experimentálních modelů autoimunitních onemocnění bylo prokázáno, že v bezmikrobních podmínkách nedochází k rozvoji onemocnění nebo je jeho průběh atenuován [Tlaskalová-Hogenová et al., 2011].

Pojem **mikrobiota** představuje slizniční a kožní mikroflóru, což jsou nepatogenní kmenzální mikroorganismy, jejichž genom se označuje termínem mikrobiom. Mikrobiota nahrazuje dřívější označení mikroflóra. Tato smíšená komunita buněk a genů, které obsahují, pomáhá při procesu trávení, růstu a obranyschopnosti. Z výzkumů vyplývá, že lidské tělo obsahuje 10krát více bakterií, plísni a jiných mikroorganismů než lidských buněk. V lidském tlustém střevě žije 10^{14} bakterií (každý z nás má ve střevě 1,3 kg bakterií), ale jsou tam také viry, plísně a paraziti. Ve zdravém lidském střevě jsou přítomny 3 hlavní bakterie rodů: Firmicutes, Actinobacteria a Bacteroides. Většina bakterií (asi 70 %) je zatím nekultivovatelných. Střevní mikrobiom je vysoce specifický pro každého jedince [Sladká, 2013].

Tradice české „**gnotobiotické školy**“ se rozvíjela od roku 1960 pod vedením prof. MUDr. Jaroslava Šterzla v Biologickém ústavu Československé akademie věd v Dolech na Novém Hrádku. V bezmikrobních podmínkách zde byla chována selata, postupně byly do gnotobiotického stavu převedeni potkani, králíci a myši. Na těchto modelech lze studovat vliv mikrobioty na etiopatogenezi lidských chorob.

Spouštěcí mechanismus autoimunitních onemocnění spojený se ztrátou autotolerance dosud nebyl plně objasněn. Jedna hypotéza označuje za iniciátora u geneticky predisponovaných jedinců infekci, u které vzhledem k podobnosti cizího a vlastního antigenu dochází k jejich zkřížené reakci [Blank et al., 2007]. Další hypotéza předpokládá, že tkáňové poškození během infekce vede k uvolnění autoantigenů, které aktivují buňky vrozené imunity nebo B lymfocyty a dále vedou k aktivaci autoreaktivních T lymfocytů [Saiga et al., 2011; Van Eden et al., 2007].

Někdy je uveitida součástí systémových onemocnění, u kterých se předpokládá infekce jako spouštěcí mechanismus. To platí např. o sarkoidóze, RS a ankylozující spondylitidě (morbus Bechtěrev). Vznik a rozvoj RS se dává do souvislosti s infekcí Chlamydia, lidským herpesvirem 6 (HHV-6) a virem Epstein-Barrové (EBV) [Pawate a Sriram, 2010]. Nicméně pátrání po infekční příčině je u idiopatické uveitidy a uveitidy u systémových onemocnění často bezvýsledné.

Modely autoimunitních onemocnění byly vyvinuty na základě imunizace evolučně konzervovanými autoantigeny spolu s jedním nebo více adjuvanty, které obsahují infekční agens, například teplem usmrcené mykobakterie a PT [Caspi et al., 1988]. Adjuvanty aktivují mechanismy vrozené imunity přes receptory asociované s patogeny (PAMP; pathogen associated molecular pattern), zahrnující nejméně čtyři třídy receptorů, zejména Toll-like receptory a lektiny C [Abbas et al., 2014]. Pro indukci autoimunitních onemocnění jsou adjuvanty zcela nezbytné, což značí důležitost infekčního agens při aktivaci autoimunity. Tento poznatek vybízí ke studiu vlivu mikrobiomu na vnímavost k autoimunitním onemocněním.

Studie nespecifických střevních zánětů prokázala nižší intenzitu onemocnění u bezmikrobních myší, což potvrdilo roli střevního mikrobiomu pro zachování imunologické rovnováhy [Biwas et al., 2011]. Tyto studie byly rozšířeny na další autoimunitní onemocnění a pro tento účel jsou gnotobiotické myši velmi cenné [Hrncir et al., 2008; Tlaskalová-Hogenová et al., 2011]. Pozoruhodné je, že citlivost vůči autoimunitním onemocněním závisí na typu choroby: například experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE) indukovaná glykoproteinem myelinem měla u bezmikrobních myší lehčí průběh [Lee et al., 2011], zatímco diabetes mellitus u NOD myší má těžší průběh [Denou et al., 2015].

Horai et al. [2015] a Nakamura et al. [2014] popsali snížení intenzity EAU u konvenčních myší po redukci střevní mikrobioty kombinací perorálně podávaných širokospektrých antibiotik. Novější práce ze stejné laboratoře [Horai et al., 2015] prezentují model spontánní uveitidy u IRBP-transgenních myší léčených antibiotiky a u GF myší. Tento model spontánní uveitidy je bližší humánní uveitidě než model s CFA, nicméně myši mají vysoké koncentrace IRBP-specifických CD4⁺ T lymfocytů. Ve skutečnosti je u kontrolních myší s EAU a u lidí koncentrace specifických T lymfocytů nízká až nedetekovatelná [Tubo et al., 2013].

Dosud nejsou publikovány práce zabývající se intenzitou EAU u bezmikrobních myší na modelu, kde je aktivace T lymfocytů indukována mykobakteriemi v CFA a je závislá na aktivaci vrozené imunity. Proto nás zajímalo, zda redukované mikrobiální prostředí u těchto myší mění aktivitu EAU.

Kapitola 2

CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem naší práce bylo zavedení reprodukovatelného modelu EAU u myši v České republice a studium autoimunitního zánětu v sítnici v průběhu zadní uveitidy včetně možností jeho ovlivnění. Intenzita zánětu byla posuzována na základě klinického a histologického hodnocení uveitidy. Byl prováděn imunohistochemický průkaz imunokompetentních buněk v místě zánětu a jejich kvantifikace v různých fázích uveitidy. Byla porovnána intenzita zánětu u bezmikrobních myši a u myši léčených perorálními antibiotiky. Dílčím cílem bylo farmakologické ovlivnění zánětu.

Hypotézy a cíle:

I. Za předpokladu, že v našich laboratorních podmínkách zavedeme stabilní a reprodukovatelný model EAU pomocí IRBP antigenu, budeme hodnotit,

A) jaké faktory ovlivňují úspěšnou indukci uveitidy u myšního modelu EAU

B) zda koreluje stupně klinického a histologického hodnocení intenzity zánětu

II. Je obecně známo, že T lymfocyty a makrofágy jsou nejpočetnějšími imunokompetentními buňkami v sítnici u myši s EAU. Naším cílem je kvantifikovat zastoupení T lymfocytů a makrofágů v sítnici v různých fázích uveitidy.

III. U některých autoimunitních onemocnění byl popsán vliv střevního mikrobiomu na intenzitu zánětu. Předpokládáme, že mikrobiom má význam také u EAU. Budeme posuzovat jeho vliv na intenzitu uveitidy včetně ovlivnění počtu imunokompetentních buněk.

IV. Účinek mykofenolát mofetilu není v léčbě autoimunitní uveitidy jednoznačný. Naším cílem je testovat účinnost mykofenolát mofetilu na modelu EAU, porovnat jeho účinek s cyklofosfamidem a objasnit, zda je mykofenolát mofetil indikován pro terapii uveitid.

Kapitola 3

MATERIÁL A METODY

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Experimentální zvířata

Myši v pokusech pocházely ze dvou chovných zařízení. Většina zvířat pocházela z chovného zařízení Centra pro experimentální biomodely 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Ve studii byly použity samice inbredních kmenů myši C57BL/6J ve stáří 6 až 8 týdnů. Použití laboratorních zvířat pro tento projekt bylo schváleno odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Se zvířaty bylo nakládáno v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 419 z roku 2012 o ochraně pokusných zvířat. Se zvířaty jsme pracovali na základě osvědčení Ministerstva zemědělství o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektu pokusů.

Bezmikrobní myši, samice i samci kmene C57BL/6J, pocházely z Laboratoře gnotobiologie Akademie věd České Republiky, v.v.i. v Hrádku v Orlických horách. Bezmikrobní myši jsou získány císařským řezem a chovány v plastových izolátorech Trexler po několik generací. Podestýlka, potrava i voda byly sterilizovány gama zářením (25 kGy) nebo autoklávovány. Sterilita byla kontrolována jednou týdně kultivací izolátoru a stolice na přítomnost aerobních i anaerobních bakterií, plísní a kvasinek. Kontrolní myši z tohoto chovu byly pravidelně kontrolovány podle mezinárodních standardů (FELASA) na přítomnost potenciálních patogenů.

3.2 Indukce EAU

Aplikace IRBP, který působí jako autoantigen, byla prováděna podle standardního protokolu [Avichezer et al., 2000; Broderick et al., 2002]. Subkutánně se aplikuje 500 µg IRBP 1-20 (fragment 1-20 proteinu IRBP, také nazývaný retinol-binding protein 3 precursor fragment [Homo sapiens] H2N-GPHTLHFQPSLVLDMAKVLLD-OH, New England Peptide, Gardner, USA). Pro rozpuštění peptidu bylo použito DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). IRBP byl emulzifikován v poměru 1:1 s CFA (Difco, USA) obsahujícím mykobakterie. Suspenze byla standardně aplikována do obou zadních končetin. U bezmikrobních myši byla subkutánní injekce provedena shora na krku vzhledem k obtížné manipulaci v izolátorech. Reaktivita imunitního systému byla podpořena intraperitoneální

aplikací 0,6 až 1,2 µg PT (pertusový toxin; List Biologicals, Campbell, USA), rozpuštěného v PBS (phosphate buffered saline).

3.3 Zásady úspěšné indukce uveitidy

Model EAU je stabilní, přesto je zásadní dodržovat pečlivě protokol. Úspěšná indukce EAU je založena na opatrné laboratorní přípravě emulze s peptidem a na jeho správné subkutánní aplikaci.

IRBP je komerčně připravován jako velmi jemný prášek, proto se doporučuje při přípravě roztoku pracovat s originální zkumavkou v adekvátním dávkování. Lyofilizovaný peptid adhezuje elektrostaticky ke stěnám zkumavky, proto je obtížné odvážit správné množství. K rozpouštění se používá DMSO. Tento roztok je dále rozpouštěn sterilní destilovanou vodou, pomalu ve 3 krocích. Po každém kroku je roztok centrifugován po dobu nejméně 3 minut rychlostí 500 otáček/minutu. Poté vznikne čirý roztok bez částic či sedimentu. Tento roztok může být uchován při teplotě pod -20°C několik měsíců i déle.

Roztok IRBP je míchán v poměru 1:1 s CFA, který obsahuje 1 mg mykobakterií v 1 ml. Tato suspenze je dále obohacena mykobakteriemi přidáním 25 miligramů teplem usmrcených H37RA mykobakterií do 10 ml CFA. Jiná možnost přípravy CFA obohaceného o aditivní mykobakterie je odsátí 7 ml čistého oleje po sedimentaci mykobakterií ze zkumavky s 10 ml CFA. První metodou získáme suspenzi o koncentraci mykobakterií 3,5 mg/ml, druhou metodou 3,3 mg/ml.

Podle našeho pozorování je účinnost emulze s IRBP antigenem závislá na důkladném promíchání. Výsledná emulze by měla být homogenní (bez separace fází), bílá, tuhá a hustá [Stromnes a Goverman, 2006]. K promíchání se užívá plastová hadička (Tub PTFE 2xHub, Hamilton Company, Nevada, USA) spojená na obou koncích se skleněnou Hamiltonovou stříkačkou o objemu 1 ml. Je doporučeno pracovat se skleněnou stříkačkou. Plastové (inzulinové) stříkačky o objemu 1 ml nejsou vyrobeny z PTFE (polytetrafluor etylen) a částice ulpívají na povrchu plastové stříkačky a tím se snižuje koncentrace roztoku. Systém spojení stříkačka-hadička-stříkačka musí být zbaven bublin, jinak se při míchání tvoří pěna. Manuální míchání trvá 15 minut a odpovídá promíchání 1000krát. Ultrazvukové míchání emulze [Maatta et al., 2000] zkracuje čas přípravy, ale vyžaduje krátké pulzy, aby nedošlo k poškození peptidu. Kvalita emulze může být otestována: pokud kapka emulze zůstane na hladině studené vody kompaktní a nerozteče se do plochy, je emulze dostatečně promíchána.

Subkutánní aplikace 50 µl emulze do každé zadní končetiny (celkem 500 µg IRBP na myš) se provádí krátkou intradermální jehlou (BD Microlance Hypodermic Needle 26G x 3/8“). Krátká jehla umožňuje přesnější a pohodlnější aplikaci. Jehlu je vhodné podržet v místě vpichu 2 až 3 sekundy, aby nedošlo k zpětnému vytékání emulze. Po aplikaci se vytvoří na kůži malá indurace, která přetrvává viditelná nebo hmatná nejméně 2 týdny. Pokud není jehla lokalizována správně, může při intramuskulární aplikaci dojít k poškození svalu.

Indukce se provádí *in vivo* a je bolestivá, proto je vhodné indukci provádět v krátkodobé analgezii ketaminem intraperitoneálně v dávce 2 mg/kg (Narkamon 50 mg/ml, Bioveta, Slovensko).

Imunitní systém je stimulován intraperitoneální aplikací 0,6 až 1,2 µg PT. Lyofilizovaný toxin *Bordetella pertusis*, skladovaný při teplotě 4°C, je rozpuštěn ve sterilní destilované vodě a rozpuštěný může být uchován při teplotě 4°C. Bezprostředně před podáním PT je dále rozpuštěn ve studeném PBS a transportován na ledu. Aplikuje se intraperitoneálně po krátkém intervalu, aby teplota roztoku stoupla na pokojovou teplotu a nezpůsobila teplotní šok.

Pro úspěšnou indukci EAU je důležité dodržovat pečlivě postup přípravy PT. Podobné podmínky práce s PT jsou vyžadovány při indukci EAE [Bernard a Carnegie, 1975].

Subkutánní instilace olejového adjuvans může být komplikovaná vznikem ulcerace v místě injekce [Whitehouse, 2012]. Ulcerace se obvykle vyvíjejí 2 až 3 týdny po injekci a byly pozorovány při indukci EAE i u jiných modelů, a to s incidencí od 0,5 % do 2 %. Většina vředů je malých (do 4 mm), ale mohou se vyskytnout i vředy velké a splývající. Po nasazení systémové imunosupresivní léčby jsme pozorovali regresí vředů. Podle našich pozorování není korelace mezi velikostí vředů a intenzitou uveitidy.

Úspěšná indukce uveitidy závisí také na výběru správného kmene myši C57BL/6J. Typ C57BL/6N je nositelem mutace sítnicové degenerace rd8 a myši od narození postrádají v různé míře fotoreceptory.

Přestože je pečlivě dodržován protokol indukce, incidence zánětu je variabilní. Zánět ovlivňují faktory jako věk a pohlaví. Pracujeme jako většina autorů se samicemi ve věku 6 až 8 týdnů, zatímco například Xu et al. [2008] pracoval se samicemi ve stáří 8 až 12 týdnů. Obecně se v pokusech používají samice, u nichž se předpokládá větší susceptibilita k EAU. Analogicky autoimunitní onemocnění převládají u žen.

Citlivost specifického kmene myši k indukci EAU může být ovlivněna zevními podmínkami. Dlouhodobě stresované myši mají zvýšené hladiny kortikosteroidů, které uveitidu potlačují. U zvířat s akutní infekcí mohou zvýšené hladiny cirkulujících interferonů potlačit rozvoj EAU [Agarwal et al., 2012].

Tyto naše osobní zkušenosti s klíčovými body v protokolu indukce uveitidy byly podkladem publikace v příloze číslo 2.

3.4 Klinické vyšetření uveitidy a klinické hodnocení EAU

Hodnocení intenzity zánětu může být provedeno klinicky *in vivo* nebo histologicky *post mortem*.

Biomikroskopické vyšetření zvířat *in vivo* bylo prováděno pomocí otoskopu (1218AA, Karl Storz, Tuttlingern, Německo), připojeného na digitální fotoaparát (Canon) adaptérem (590-70, Karl Storz) a na zdroj studeného světla (69111001, Karl Storz).

Myši byly vyšetřovány v celkové intraperitoneální kombinované anestezii ketaminem 80 mg/kg (Narkamon 50 mg/ml, Bioveta, Slovensko) a xylazinem 5 mg/kg (Rometar 20 mg/ml, Bioveta, Slovensko). Pro dilataci zornice byl lokálně aplikován tropikamid (Unitropic 1% oph. gtt., Unimed Pharma, Slovensko) a phenylephrin (Neosynephrin-Pos 10 %, Ursapharm, Česká republika). Na rohovku pokrytou vrstvou viskomateriálu byl přikládán otoskop připojený k zevnímu zdroji světla a na fotoaparát s předsazenou čočkou +4,0 dioptrie (obrázek 5) [Paques et al., 2007; Copland et al., 2008, Xu et al., 2008].

Liché počty očí v některých sledovaných skupinách jsou důsledkem vrozených malformací očí s atrofií bulbu, které se u inbredních myší vyskytují.



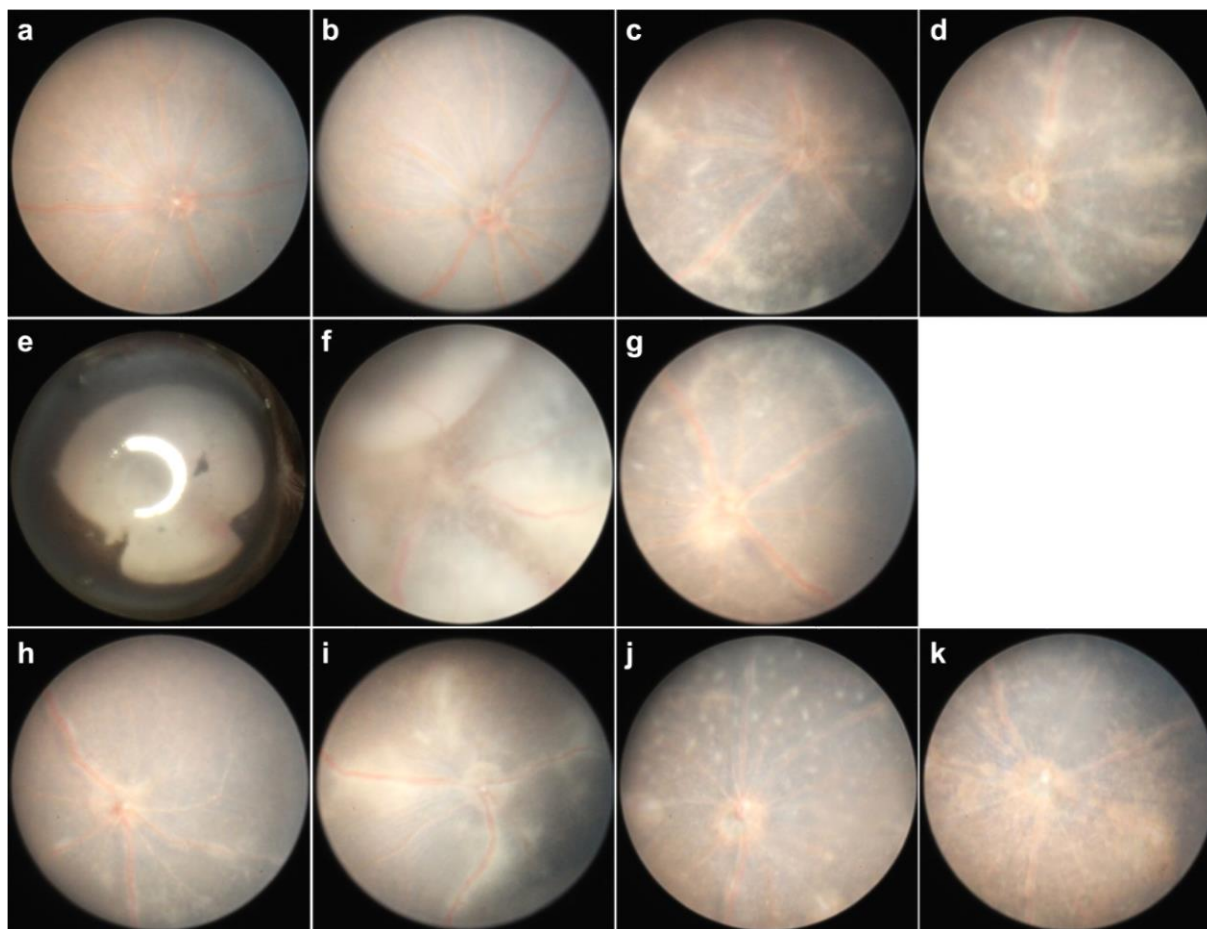
Obrázek 5 - Biomikroskopie sítnice pomocí otoskopu

Klinický systém hodnocení známek zánětu zjištěných při biomikroskopii popisuje Xu et. al. [2008], viz tabulka 2. Hodnotí 4 parametry: velikost a tvar infiltrátů sítnice, zánětlivé změny zrakového nervu, stupeň opouzdření cév a strukturální změny sítnice (atrofie/jizvy).

Tabulka 2 - Klinické hodnocení intenzity zánětu

| Stupeň | Infiltráty sítnice | Zrakový nerv- infiltrace | Retinální cévy | Strukturální změny |
|--------|---|-----------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | 1-4 malé léze nebo 1 lineární léze | minimální | rozšířené cévy | zánět či atrofie na < ¼ plochy sítnice |
| 2 | 5-10 malých lézí nebo 2-3 lineární léze | mírná | 1-4 malá opouzdření | zánět či atrofie mezi ¼ a ¾ plochy sítnice |
| 3 | > 10 malých lézí nebo > 3 lineární léze | střední | > 4 malá nebo 1-3 větší opouzdření | panretinální atrofie s < 3 lineárními lézemi (jizvami) |
| 4 | lineární konfluentní léze | střední | > 3 větší nebo 1 velké opouzdření | panretinální atrofie s > 3 lineárními lézemi (jizvami) |

Známky zánětu na fotografiích sítnice zachycují vaskulitidu, sítnicové infiltráty a edém optického nervu (obrázek 6).



Obrázek 6 - Fotografie sítnice a předního segmentu u myši v různých intervalech po indukci EAU

- (a), (b) Fyziologický fundus u myši
- (c), (d) Fotografie sítnice 20. den po indukci EAU
- (e) Zadní synechie na fotografii předního segmentu přítomné 25. den po indukci EAU
- (f) Totální amoce 25. den po indukci EAU
- (g) Fotografie fundu 25. den po indukci EAU
- (h), (i) Fotografie fundu 35. den po indukci EAU
- (j), (k) Fotografie fundu 60. den po indukci EAU

Klinické projevy EAU včetně bohaté obrazové dokumentace jsou podkladem publikace v příloze číslo 3.

3.5 Histologické zpracování materiálu a histologické hodnocení EAU

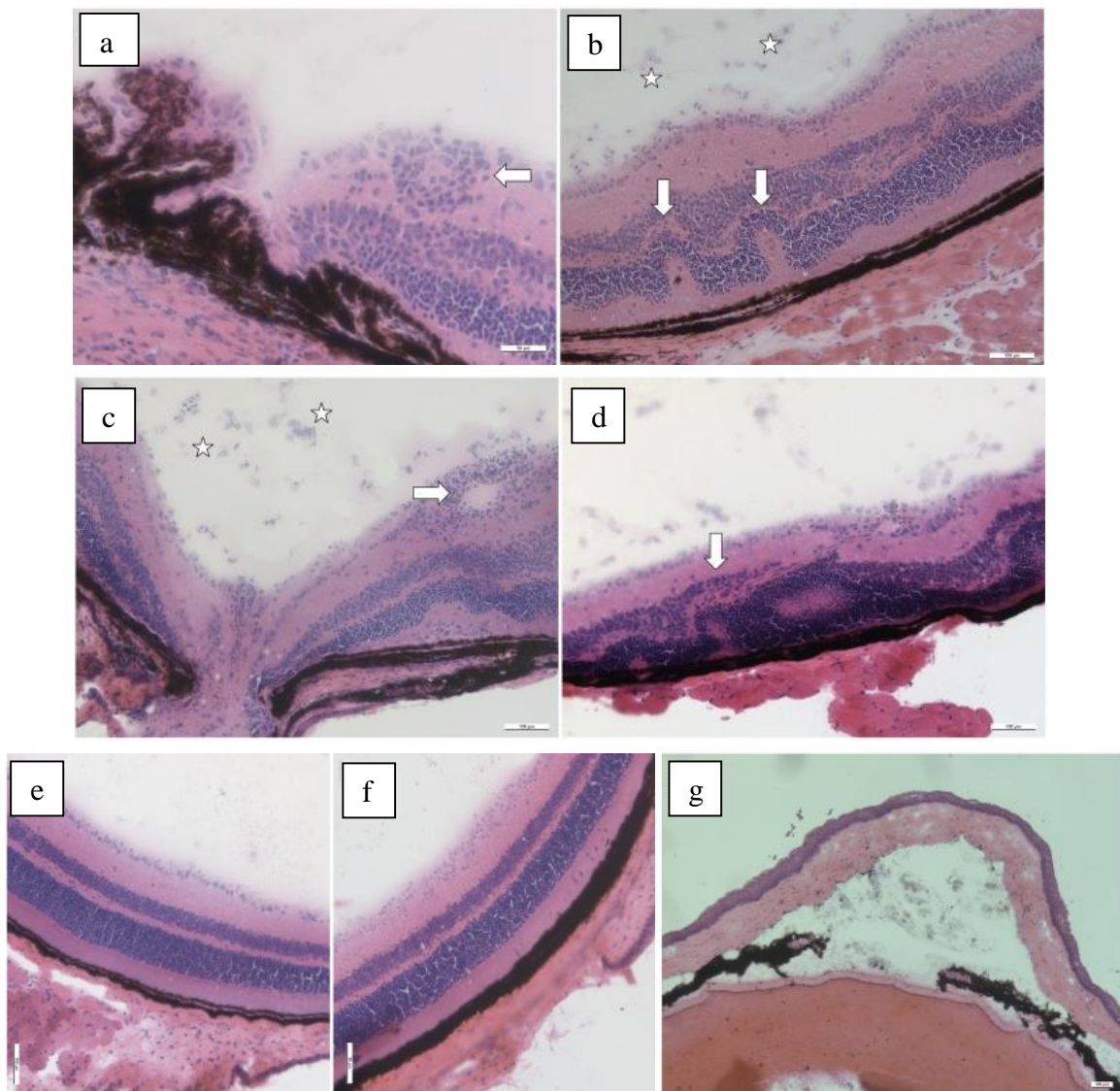
Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací podle etických pravidel daných zákonem České republiky. Oči byly enukleovány vystříháním ze spojivkového vaku bezprostředně *post mortem* 35. den po indukci EAU. Oči byly vloženy do gelového media (Tissue-Tek® O.C.T. Compound™, Sakura, Zoeterwoude, Holandsko) a zamraženy ve 2-methylbutanu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) v atmosféře tekutého dusíku. Vzorky zmražené na -70°C byly krájeny na mikrotomu (Leica CM 1850) na $7\ \mu\text{m}$ silné řezy při teplotě -19 až -21°C . Řezy byly vedeny vždy z periferie a z oblasti optického nervu obou očí. Vzorky byly barveny hematoxylin-eozinem podle standardního protokolu. Vzorky byly odebrány z obou očí, vzhledem k tomu, že zánět může být asymetrický.

Mikroskopické hodnocení histologických řezů barvených hematoxylin-eozinem se provádí podle zavedeného systému hodnocení od stupně 0 (žádný zánět) do stupně 4 (silný zánět) podle Caspi [Caspi et al., 1988; Thurau et al., 1997; Dick et al., 1994], viz tabulka 3.

Tabulka 3 - Systém histologického hodnocení zánětu EAU

| Stupeň | Popis |
|------------|---|
| 0 | žádné známky zánětu |
| 0,5 | malé buněčné infiltráty v ciliárním tělese nebo subretinálním prostoru, negranulomatózní infiltráty v sítnici |
| 1 | místa malé retinální záhyby, jednotlivé granulomatózní infiltráty, mírná vaskulitida, mírná vitritida |
| 2 | mírná až střední ztráta fotoreceptorů, 2 středně velké retinální záhyby na řezu, 1-2 retinální granulomy, vaskulitida $< 10\%$ cév, mírná až střední vitritida, buňky v přední komoře |
| 3 | výrazná ztráta fotoreceptorů, 3 a více středních až velkých retinálních záhybů, více než 3 granulomatózní infiltráty, vaskulitida $10-50\%$ cév, výrazná vitritida |
| 4 | výrazná ztráta fotoreceptorů, velké retinální záhyby nebo odchlípení sítnice, subretinální exsudát, více než 3 velké granulomy, vaskulitida $> 50\%$ cév, výrazná vitritida |

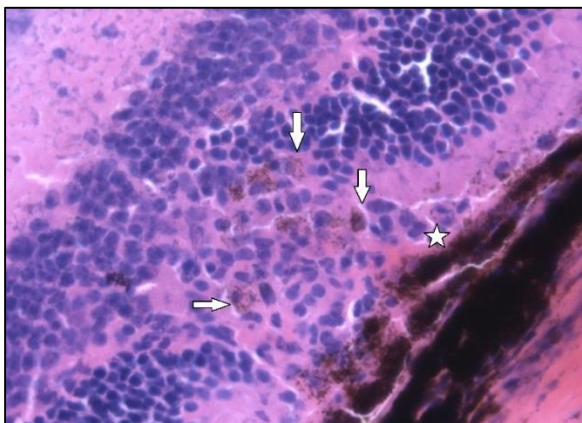
Mezi histologické známky zadní uveitidy patří retinální záhyby, zánětlivá ložiska v sítnici, často lokalizovaná v ciliárním tělísku, vaskulitida, vitritida, neovaskularizace sítnice či ztráta zevních segmentů fotoreceptorů (obrázek 7a-d). Sítnice u zdravých myší má zřetelně oddělené vrstvy sítnice bez nepravidelností (obrázek 7e,f).



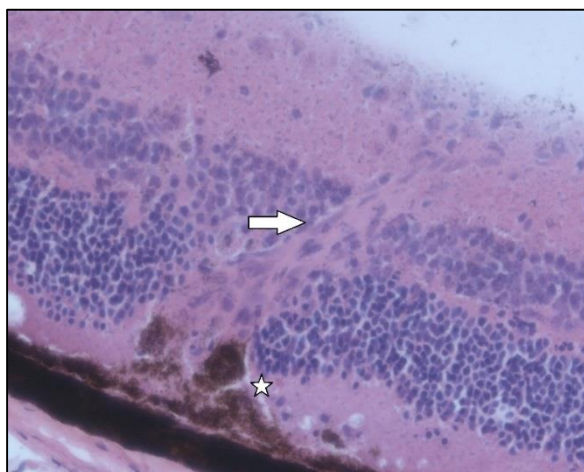
Obrázek 7 - Histologické řezy očí u zdravých myší a u myší 35. po indukci EAU barvené hematoxylinem a eozinem

- (a) Zánětlivé ložisko v sítnici v blízkosti ciliárního tělesa (šipka), zvětšení 40x
- (b) Retinální záhyby v sítnici (šipky), ve sklivci jsou přítomny zánětlivé buňky (hvězdičky), zvětšení 20x
- (c) Zánětlivá infiltrace v okolí retinální cévy v blízkosti terče zrakového nervu (šipka), ve sklivci jsou zánětlivé buňky (hvězdičky), zvětšení 20x
- (d) Novotvořená céva prochází vrstvami sítnice (šipka), zvětšení 20x
- (e), (f) Histologický řez sítnicí zdravé myši, zvětšení 20x
- (g) Histologický řez přední částí oka, předněkomorová tekutina je zkalená, duhovka je překrvená, jsou přítomny přední i zadní synechie. Obrovská čočka fyziologicky vyplňuje velkou část oka. Zvětšení 10x

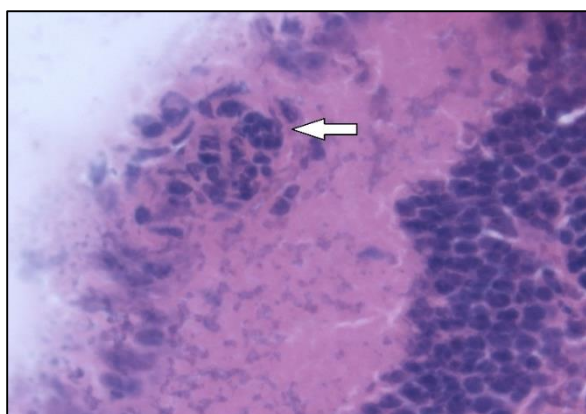
Zánětlivé změny probíhají také v RPE. Dochází k hyperplazii pigmentového epitelu (obrázek 8 a 9) a proliferaci mikroglie, která pigment fagocytuje. Kumulaci zánětlivých buněk ve vnitřních vrstvách sítnice ukazuje obrázek 10.



Obrázek 8 - Histologický řez sítnicí 35. den po indukci EAU. Hyperplazie retinálního pigmentového epitelu (hvězdička), v sítnici jsou buňky s fagocytovaným pigmentem (šipky)



Obrázek 9 - Histologický řez sítnicí 35. den po indukci EAU. Hyperplazie retinálního pigmentového epitelu (hvězdička) akcentovaná v místě novotvořené cévy zachycené na podélném průřezu (šipka)



Obrázek 10 - Histologický řez sítnicí 35. den po indukci. Šipka označuje infiltrát nejspíše lymfocyto-mononukleární

3.6 Imunohistochemie

Imunohistochemický průkaz T lymfocytů a makrofágů v sítnici u myši C57BL/6 byl proveden na mražených řezech. Při každém pokusu bylo provedeno barvení na pozitivní (slezina s primární i sekundární protilátkou) a negativní kontrole (slezina bez primární protilátky).

Vývoj počtu T lymfocytů a makrofágů v sítnici byl hodnocen 10., 20., 25., 35. a 60. den po indukci EAU. V každé skupině bylo hodnoceno 5 až 8 očí, na každém oku ideálně z řezu z oblasti periferní sítnice a z oblasti terče zrakového nervu.

3.6.1 Průkaz CD3+ buněk

Detekce T lymfocytů byla provedena třístupňovou peroxidázovou reakcí s primární králičí protilátkou proti lidskému CD3 antigenu (Rabbit Polyclonal Anti-Human, CD3, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko) rozpuštěnou v koncentraci 1:200 v PBS a 1,5% normálním kozím séru. Protilátka proti lidskému CD3 antigenu zkříženě reaguje s myšími antigeny [Jones et al., 1993]. Vizualizace vazby primární protilátky byla provedena s použitím sekundární biotinylované králičí protilátky (Dako) a standardní soupravy Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, USA).

Imunofluorescenční průkaz T lymfocytů byl proveden třístupňovou metodou s primární králičí protilátkou proti lidskému CD3 antigenu (Rabbit Polyclonal Anti-Human, CD3, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko) rozpuštěnou v koncentraci 1:100 v PBS a normálním kozím séru. Vizualizace vazby primární protilátky byla provedena s použitím sekundární biotinylované králičí protilátky (Dako) a fluorescenčních barviv CY 5 a Streptavidin AF 532, včetně barvení jader (DAPI) a standardní soupravy Vectashield (Vector Laboratories, USA). Zobrazení bylo provedeno na laserovém konfokálním skenovacím mikroskopu Olympus FluoView™ FV1000.

3.6.2 Průkaz F4/80+ buněk

Monoklonální protilátka F4/80 je používána k detekci makrofágů, barví zkříženě mikroglie, ale i malou frakci dendritických buněk. Makrofágy byly detekovány třístupňovou peroxidázovou reakcí s primární krysí monoklonální protilátkou F4/80 (Rat monoclonal [BM8] to F4/80, Abcam, Cambridge, Velká Británie) rozpuštěnou v koncentraci 1:100 v PBS a 1,5% normálním kozím séru. Vizualizace vazby primární protilátky byla provedena použitím

biotinylované kryší protilátky (Abcam) a standardní soupravy Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, USA).

3.7 Průtoková cytometrie

Myší buňky z mezenterálních a krčních uzlin byly izolovány a propláchnuty v kompletním RPMI médiu (Roswell Park Memorial Institute médium standardizované pro buněčné kultury), profiltrovány přes buněčný filtr o průměru 70 μm a obarveny monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorescenčními barvivy. Pro barvení intracelulárními protilátkami byly buňky (2×10^6 bb/ml kompletního RPMI) inkubovány 5 hodin s 50 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), 500 ng/ml ionomycinu (Sigma-Aldrich) a 2 μM Monensinu (eBioscience) a potom propláchnuty, blokovány anti-CD16/CD32 protilátkou, fixovány a permeabilizovány přes noc s fixačním/permeabilizačním pufrem (Fixation/Permeabilization buffer; eBioscience), intracelulárně obarveny protilátkami proti IFN- γ , IL-17, TNF- α a Foxp3, analyzovány pomocí průtokového cytometru FACSCalibur a vyhodnoceny pomocí FlowJo software. Všechny monoklonální protilátky pocházely od eBioscience (San Diego, USA).

3.8 Léčba antibiotiky

Pro snížení mikrobiální nálože byly myši léčeny širokospektrými antibiotiky: směs metronidazolu 500 mg/l (B. Braun, Melsungen, Německo) a ciprofloxacinu 100 mg/l (Ciprinol 100 mg/10 ml, Krka, Česká republika) v pitné vodě podle zavedených postupů [Klimesova et al., 2013]. Metronidazol patří mezi imidazolová antibiotika, účinkuje na prvoky a většinu Gram-negativních a Gram-positivních anaerobních bakterií. Ciprofloxacin patří mezi fluorochinolony druhé generace, jeho účinek je na Gram-negativní a Gram-positivní bakterie. Myším byla podávána širokospektrá antibiotika ve dvou režimech.

3.8.1 Zahájení léčby týden před indukcí EAU

Myším byla podávána antibiotika v pitné vodě ad libitum týden před indukcí a po celou dobu experimentu do 35. dne po indukci.

3.8.2 Zahájení léčby v den indukce EAU

Antibiotika perorálně byla podávána ad libitum ode dne indukce do konce experimentu 35. den po indukci.

3.9 Imunoterapie EAU

Byly srovnávány 4 skupiny léčených myší a 2 skupiny kontrolních myší. Ve skupině léčených myší byly 2 skupiny léčené MMF (Cellcept 1 g/5 ml, Roche, Welwyn Garden City, Velká Británie). MMF byl aplikován intraperitoneálně denně v dávce 30 mg/kg a v dávce 50 mg/kg. Další skupina myší byla léčena CF (Endoxan 1 g, Baxter, Halle, Německo). CF byl aplikován intraperitoneálně v jediné dávce 100 mg/kg. Poslední skupina byla léčena golimumabem (Simponi 50 mg, Janssen Biologics, Leiden, Holandsko). Golimumab byl aplikován subkutánně týdně v dávce 70 mg/kg. Kontrolní skupiny byly 2: skupina s EAU bez léčby a skupina s sham léčbou (aqua pro injectione aplikovaná intraperitoneálně).

3.10 Statistická analýza

Data byla zpracována pomocí programu GraphPad Prism, verze 6.04 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA, www.graphpad.com). K porovnání mezi skupinami byly použity neparametrické testy Kruskalův-Wallisův a Mann-Whitneyův. Hodnota $p < 0,05$ byla hodnocena jako signifikantní.

Kapitola 4

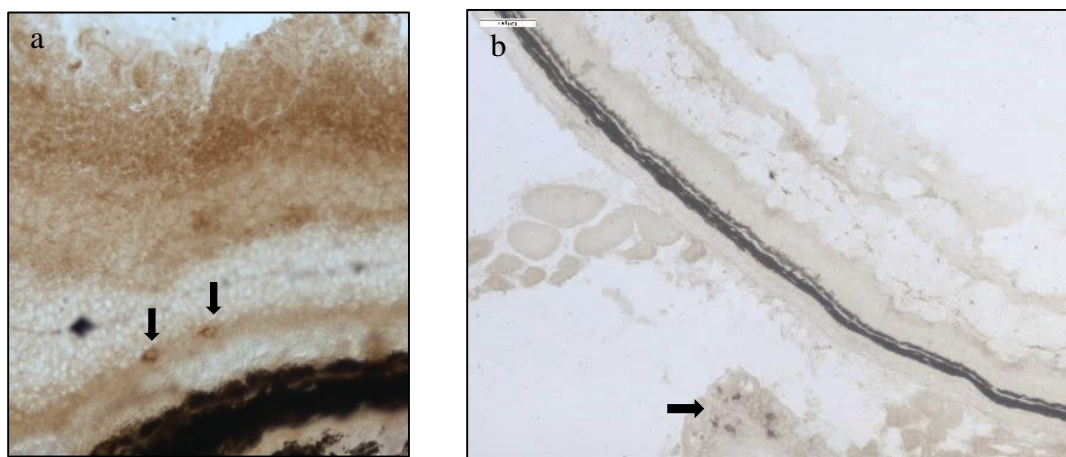
VÝSLEDKY

4 VÝSLEDKY

4.1 Zastoupení CD3+ a F4/80+ buněk v sítnici v průběhu zánětu na řezech barvených imunohistochemickými metodami

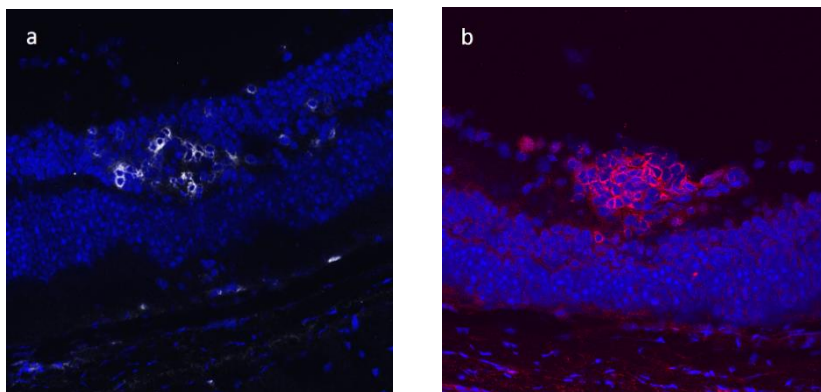
4.1.1 CD3+ buňky

Molekula CD3 je na povrchu T lymfocytu svázána s receptorem T lymfocytů (TCR). Peptidová sekvence CD3 molekuly je vysoce konzervovaná a je ve 100 % shodná u lidí i myši, proto zkříženě reaguje mezi myšimi a lidskými T lymfocyty [Jones et al., 1993]. Používaná protilátka proti CD3+ buňkám je syntetický peptid a je specifická pouze pro T lymfocyty. T lymfocyty jsou hlavními imunokompetentními buňkami, které se účastní autoimunitní reakce v průběhu EAU, a to zejména v pozdní fázi. Imunohistochemickým průkazem CD3+ buněk byly detekovány aktivované T lymfocyty v myší sítnici (obrázek 11 a 12).



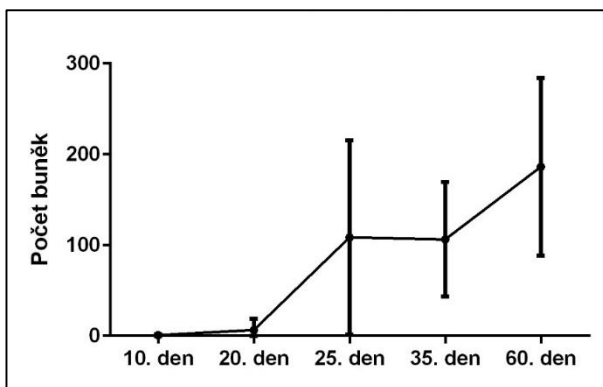
Obrázek 11 - (a) Ve vrstvě zevních segmentů fotoreceptorů sítnice jsou zachyceny dvě CD3+ buňky (šipky), 35. den po indukci EAU, zvětšení 40x, (b) fyziologicky nejsou v sítnici T lymfocyty přítomny, lymfocyty se zobrazují v přilehlé extraokulární tkáni (šipka), zvětšení

20x



Obrázek 12 - (a),(b) Ložiska CD3+ buněk ve vnitřní vrstvě sítnice po barvení imunofluorescenční metodou

Počet T lymfocytů v sítnici v průběhu zánětu stoupá (graf 1). Výrazný nárůst počtu T lymfocytů je 25. den od indukce EAU, kdy klinicky zaznamenáváme vrchol uveitidy. Postupně dochází ke kumulaci zánětlivých buněk a v pozdní fázi zánětu, v našem sledování 60. den, je počet T lymfocytů nejvyšší.

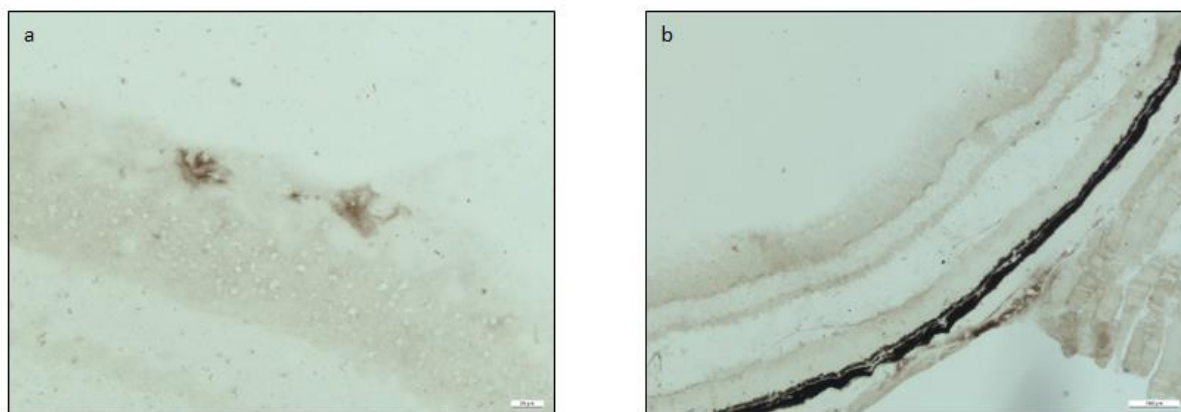


Graf 1. Počet T lymfocytů v různých intervalech od indukce EAU

T lymfocyty jsou zachyceny v sítnici od 10. dne po indukci EAU. Větší nárůst počtu T lymfocytů v sítnici pozorujeme od 25. dne od indukce EAU. Počet T lymfocytů stoupá v čase nerovnoměrně, nejstrmější vzestup pozorujeme mezi 20. a 25. dnem od indukce.

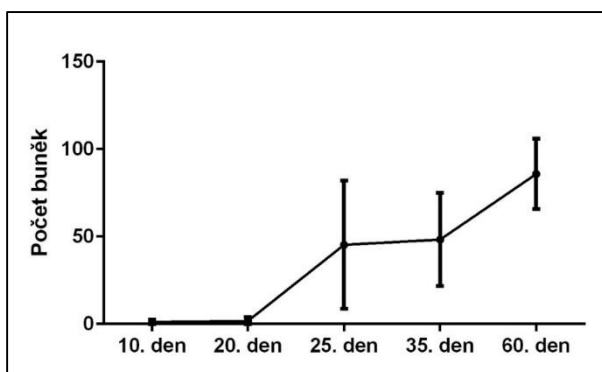
4.1.2 F4/80 + buňky

Monoklonální krysí protilátka F4/80 je běžně používána k detekci myších makrofágů (obrázek 13), nicméně barví zkříženě mikroglie, ale i malou frakci dendritických buněk. Makrofágy jsou hlavními antigen prezentujícími buňkami, účastní se zánětu v akutní i chronické fázi.



Obrázek 13 - (a) Ve vnitřních vrstvách sítnice jsou detekovány dvě F4/80+ buňky 35. den po indukci EAU, zvětšení 63x (b) fyziologicky nejsou v sítnici makrofágy přítomny, zvětšení 20x

Počet makrofágů v sítnici v průběhu zánětu stoupá (graf 2). Do 20. dne se makrofágy v sítnici prakticky nevyskytují, výrazný nárůst počtu makrofágů je 25. den po indukci, kdy klinicky zaznamenáváme vrchol uveitidy. Postupně dochází ke kumulaci zánětlivých buněk a v pozdní fázi zánětu, v našem sledování 60. den, je počet makrofágů nejvyšší.



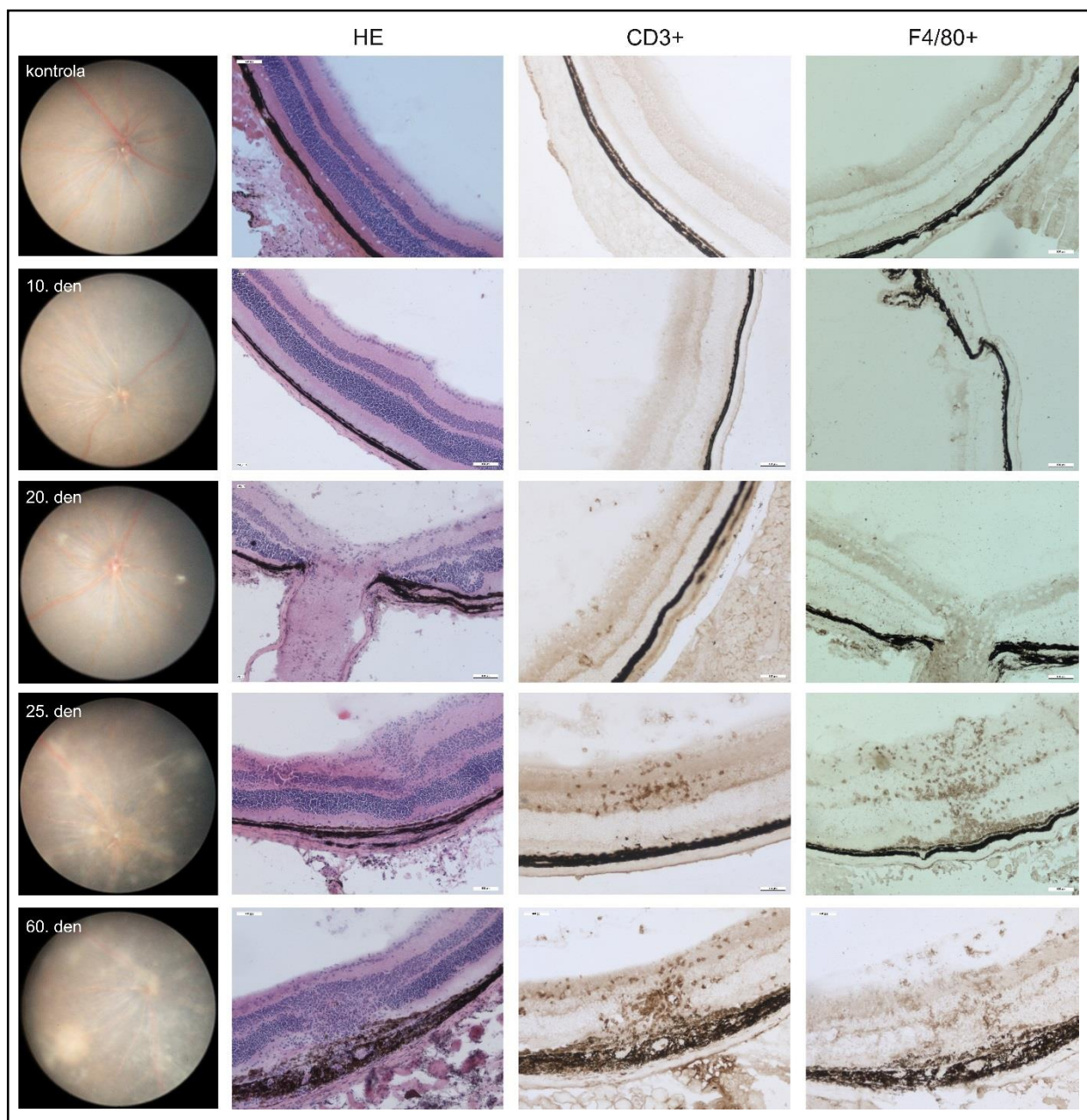
Graf 2 - Počet makrofágů v různých intervalech od indukce EAU

Makrofágy v sítnici pozorujeme od 20. dne po indukci EAU. Nárůst počtu makrofágů je nerovnoměrný. Nejstrmější vzestup je mezi 20. a 25. dnem po indukci.

Infiltrace sítnice T lymfocyty podle našich výsledků nastává od 10. dne po indukci, infiltrace makrofágy až od 20. dne po indukci. Celkový počet T lymfocytů proti makrofágům je v pozdní fázi více než dvojnásobný.

Z histologických řezů je patrné, že v pozdní fázi makrofágy lemují zánětlivé ložisko tvořené T lymfocyty a podílí se tak na úklidové reakci (obrázek 14).

Na histologických řezech zdravých kontrol nebyly žádné T lymfocyty ani makrofágy zachyceny.



Obrázek 14 - Dynamika změn 10., 20., 25. a 60. den po indukci EAU při klinickém vyšetření, na histologickém řezu barveném hematoxylin eozinem a po imunohistochemickém barvení na T lymfocyty (CD3+) a makrofágy (F4/80+)

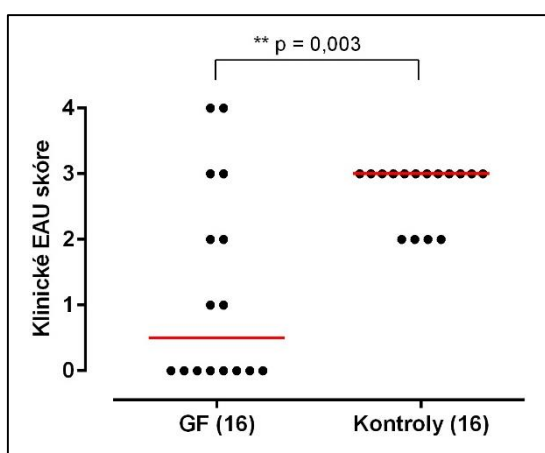
4.2 Vliv mikrobiální flóry na průběh zánětu

Naším cílem bylo zhodnotit vliv redukovaného mikrobiálního prostředí (bezmikrobní myši a myši léčené antibiotiky) na intenzitu zánětu u myšního modelu EAU indukovaného pomocí IRBP 1-20 a potencovaného CFA a PT.

Intenzita nitroočního zánětu byla sledována ve 3 skupinách: A) bezmikrobní myši, B) myši léčené perorálními antibiotiky (ATB, metronidazol a ciprofloxacín) profylakticky, podávanými v pitné vodě týden před indukcí EAU a po dobu experimentu, C) myši léčené ATB v pitné vodě ode dne indukce EAU. Intenzita zánětu byla porovnána s kontrolní skupinou EAU. Klinické hodnocení bylo provedeno *in vivo* pomocí otoskopu podle zavedeného protokolu (tabulka 2, kapitola 3.4). Histologické hodnocení bylo odečteno 35. den po indukci na řezech barvených hematoxylin eozinem ve škále 0 až 4 (tabulka 3, kapitola 3.5).

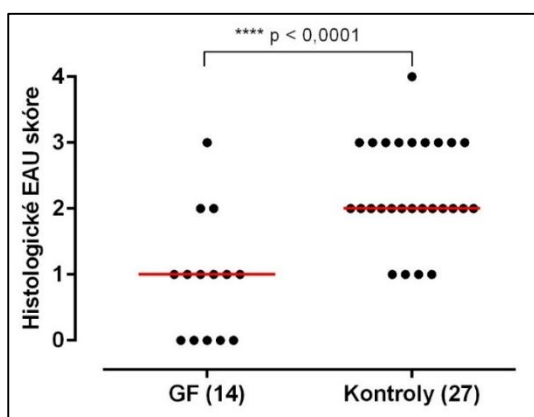
4.2.1 Bezmikrobní myši (skupina A)

U bezmikrobních myší byla intenzita zánětu ve srovnání s kontrolní skupinou signifikantně nižší v hodnocení klinickém (graf 3; $p = 0,003$) i histologickém (graf 4; $p < 0,0001$). Klinické vyšetření sítnice ukázalo minimální nebo žádné zánětlivé změny, zatímco u kontrolních myší byly přítomny retinální malé i lineární léze, edém terče zřetelného nervu a opouzdření cév (obrázek 15). V histologickém hodnocení byly přítomny známky uveitidy u obou skupin, významně méně ve skupině bezmikrobních myší (obrázek 16).



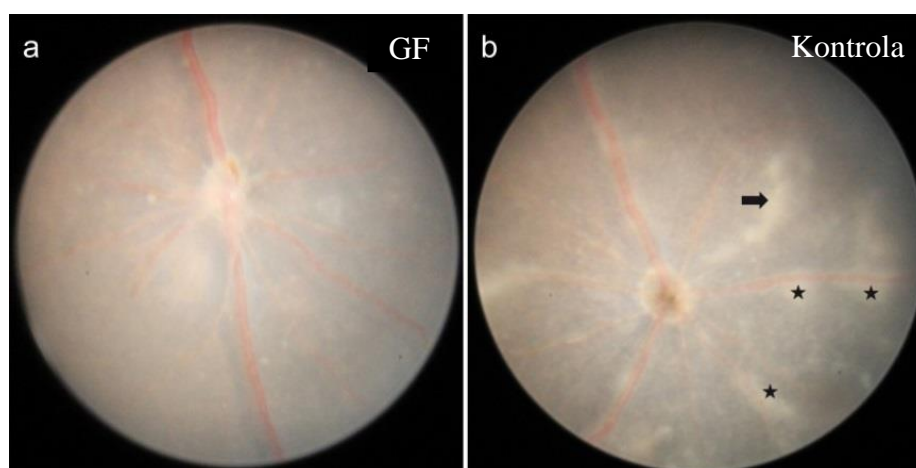
Graf 3 - Srovnání **klinického** hodnocení intenzity zánětu

Bezmikrobní myši (GF, germ-free) mají při klinickém hodnocení intenzity zánětu 35. den po indukci signifikantně nižší zánět než kontrolní skupina ($p = 0,003$). Čísla v závorkách představují počty očí. Mediány jsou zobrazeny červeně.



Graf 4 - Srovnání **histologického** hodnocení intenzity zánětu

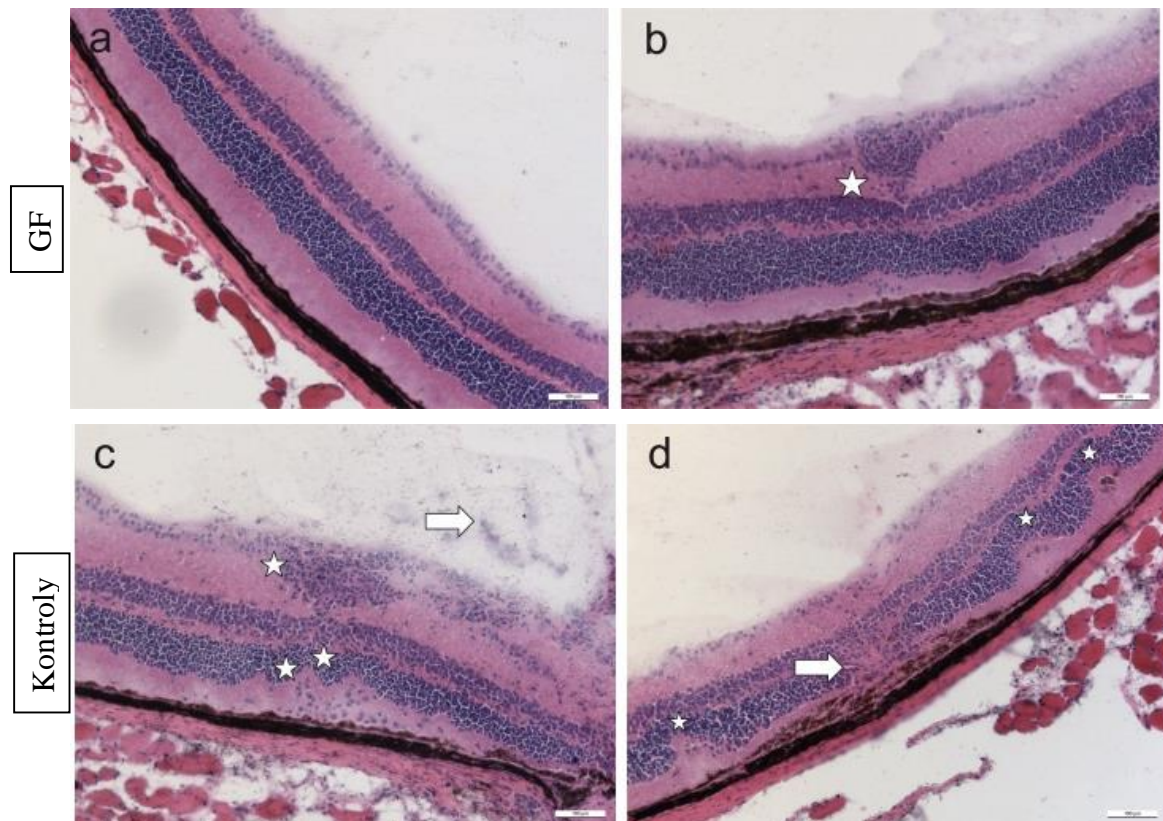
Bezmikrobní myši (GF, germ-free) mají při histologickém hodnocení intenzity zánětu 35. den po indukci signifikantně nižší zánět než kontrolní skupina ($p < 0,0001$). Čísla v závorkách představují počty očí. Mediány jsou zobrazeny červeně.



Obrázek 15 - Fotografie fundu 35. den po indukci u bezmikrobní myši (a) a kontrolní myši (b)

(a) Sítňice bez patrných zánětlivých změn

(b) Na sítnici jsou přítomny malé léze, lineární léze (šipka) a opouzďení cév (hvězdičky)



Obrázek 16 - Histologické řezy sítnice barvené hematoxylin eozinem u bezmikrobních myší (a,b) a kontrolních myší (c,d), měřítko 100 μm zobrazeno na snímcích

(a) Sítnice bez zánětlivých změn

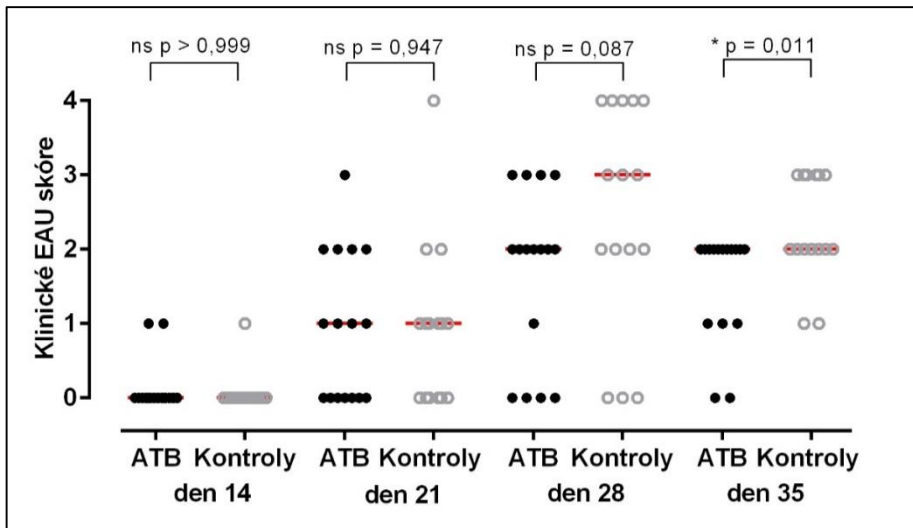
(b) Ve vnitřní vrstvě sítnice je zánětlivé ložisko (hvězdička)

(c) Sítnice s výraznými projevy zánětu, zánětlivé ložisko označeno hvězdičkou, retinální záhyby označeny dvojitou hvězdičkou, ve sklivci jsou přítomny zánětlivé buňky (šipka)

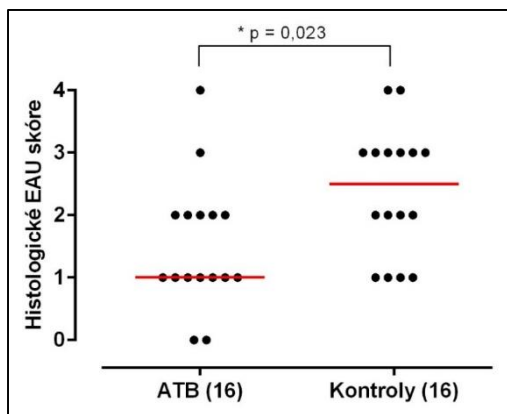
(d) Ložisko neovaskularizace nad narušenou vrstvou pigmentového epitelu (šipka), retinální záhyby jsou označeny hvězdičkou

4.2.2 Myši léčené antibiotiky profylakticky (skupina B)

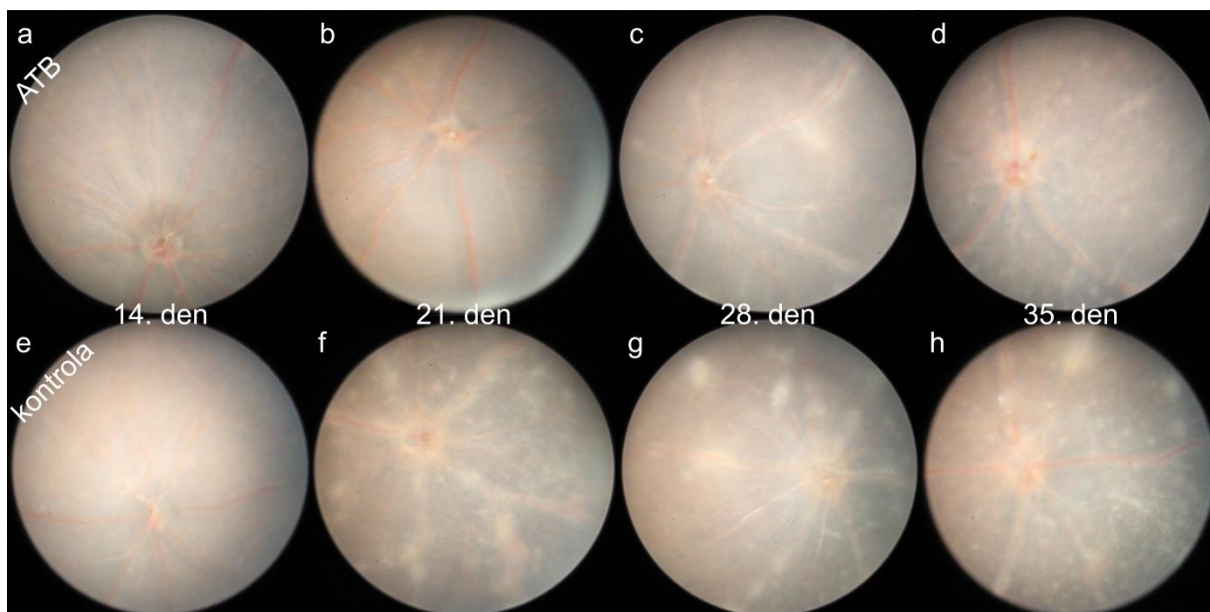
Léčba metronidazolem a ciprofloxacinem byla zahájena týden před indukci a probíhala po celou dobu experimentu. Kombinace širokospektrých antibiotik sníží mikrobiální nálož ve střevě a významně změní složení mikrobioty [Klimesova et al., 2013]. Léčba ATB týden před indukci vedla k signifikantnímu snížení klinického stupně zánětu oproti neléčeným kontrolám, s největším rozdílem pozorovaným 35. den (graf 5; $p = 0,011$). Toto bylo potvrzeno histologickým vyšetřením 35. den, kdy intenzita zánětu byla významně snížena (graf 6; $p = 0,023$). Biomikroskopické vyšetření sítnice bylo provedeno 14., 21., 28. a 35. den po indukci (obrázek 17). Histologické hodnocení bylo provedeno 35. den po indukci (obrázek 18).



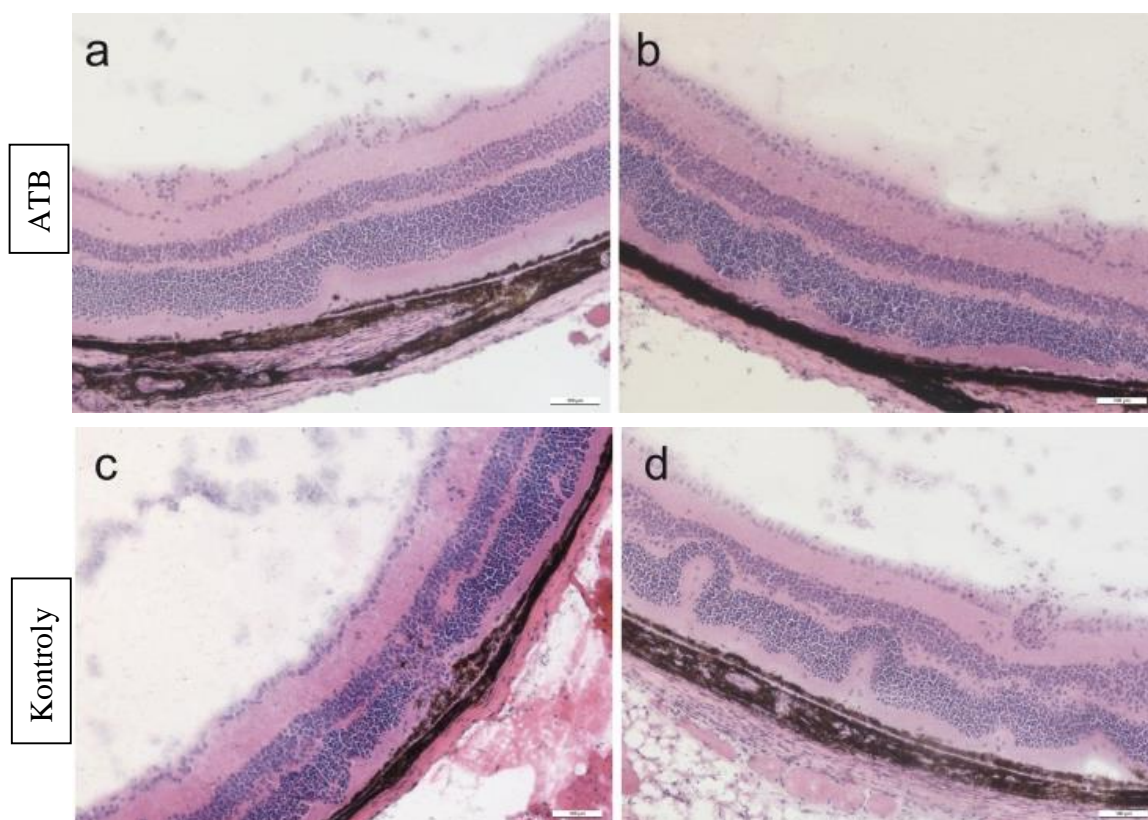
Graf 5 - Srovnání **klinického** hodnocení intenzity zánětu v den 14, 21, 28 a 35 *in vivo* u myši léčených ATB týden před indukcí EAU a kontrolních myši. Signifikantní výsledek mezi skupinami je 35. den po indukci ($p = 0,011$). Mediány jsou zobrazeny červeně.



Graf 6 - Srovnání **histologického** hodnocení intenzity zánětu u myši 35. den po indukci na řezech barvených hematoxylin-eozinem u myši léčených ATB týden před indukcí a kontrolních myši. Kontrolní skupina ukazuje signifikantní rozdíl v intenzitě zánětu ($p = 0,023$). Čísla v závorkách jsou počty očí ve skupině. Mediány jsou zobrazeny červeně.



Obrázky 17 - Fotografie sítnice u myši léčené ATB týden před indukci v den 14 (a), 21 (b), 28 (c), 35 (d) a u kontrolní myši v den 14 (e), 21 (f), 28 (g), 35 (h)



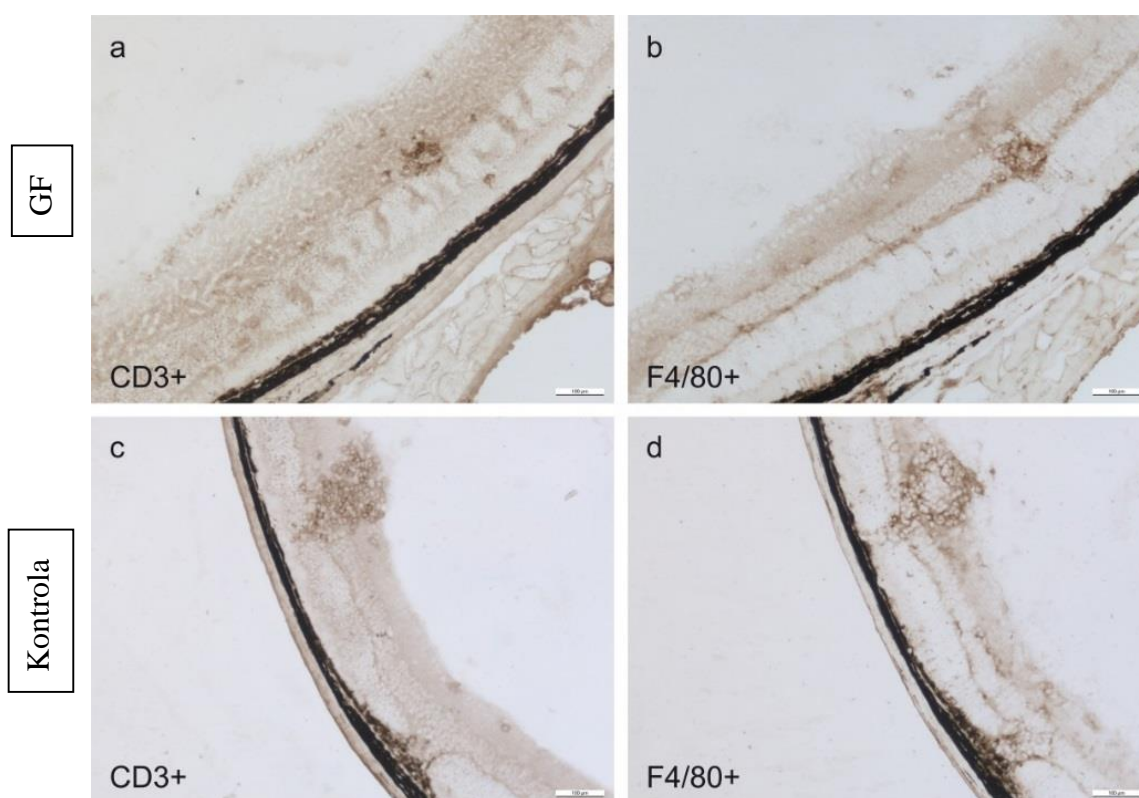
Obrázek 18 - Histologické řezy barvené hematoxylin eozinem u myši léčených ATB týden před indukci (a, b) a kontrolní myši s EAU (c, d). Měřítko 100 μ m je zobrazeno na snímcích

4.2.4 Imunohistochemie

4.2.4.1 Bezmikrobní myši (skupina A)

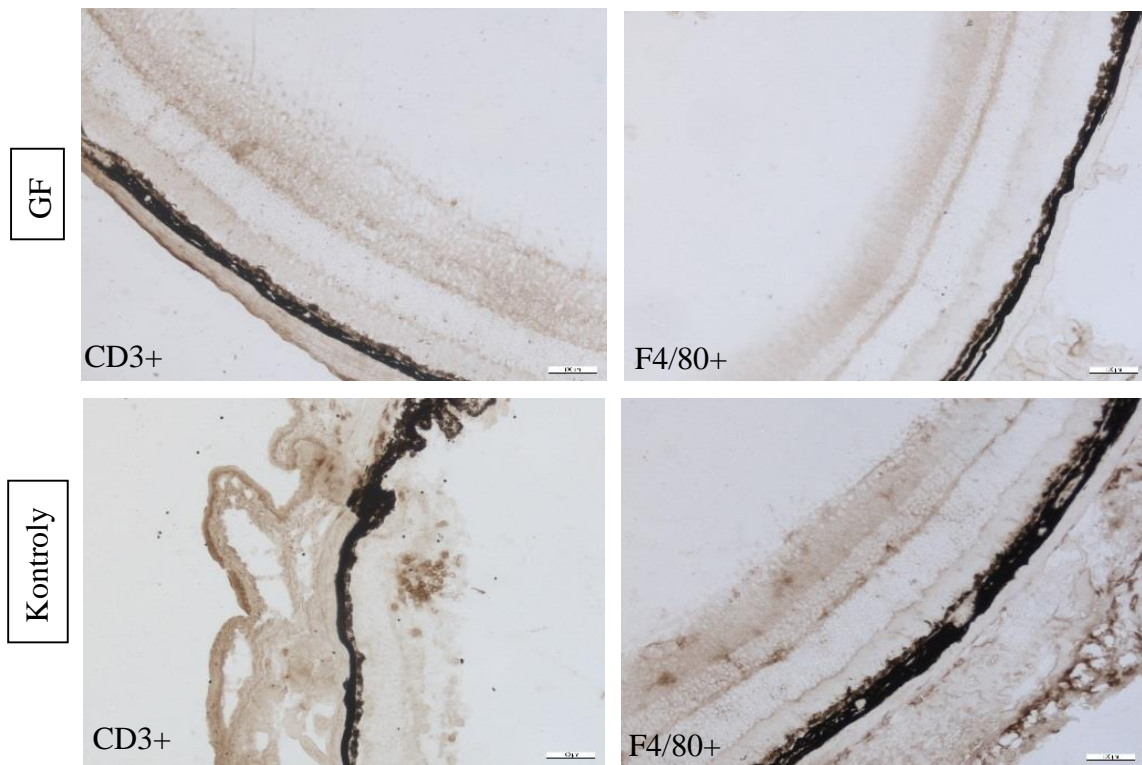
Oči bezmikrobních myši a kontrolních myši byly analyzovány imunohistochemicky se zaměřením na průkaz CD3+ buněk odpovídající T lymfocytům a F4/80+ buněk odpovídající makrofágům přítomným v sítnici 35. den po indukci EAU.

Struktura granulomu má charakteristické uspořádání, v centru ložiska jsou zastoupeny T lymfocyty, na okraji jsou lemovány makrofágy (obrázek 19). Toto uspořádání je přítomné u bezmikrobních i kontrolních myši.

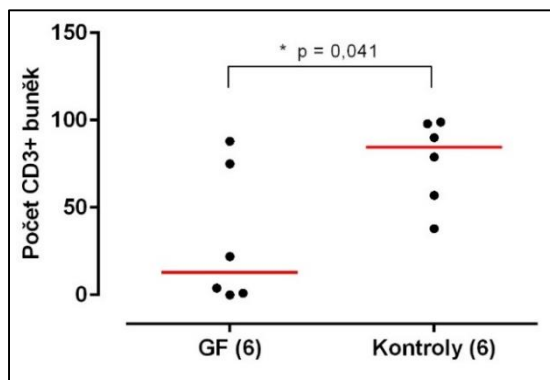


Obrázek 19 – Imunohistochemický průkaz ložiska s buňkami CD3+ a F4/80+ v sítnici u bezmikrobní myši (GF) (a, b) a kontrolní myši (c, d) 35. den po indukci

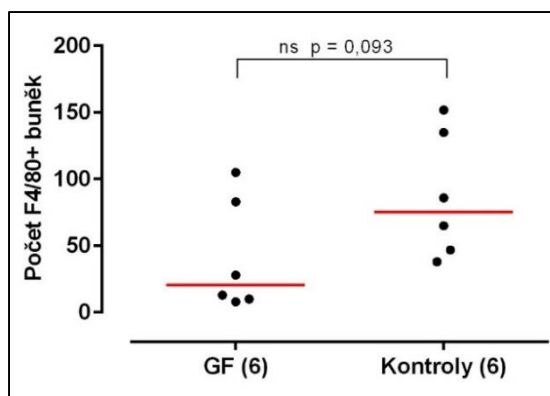
V sítnici byl u bezmikrobních myši počet T lymfocytů nižší signifikantně (graf 9; $p < 0,05$) a počet makrofágů nižší nesignifikantně (graf 10; $p = 0,093$), což je patrné i z obrázku 20. Nižší počet zánětlivých buněk v sítnici bezmikrobních myši koreluje s nižší intenzitou uveitidy zjištěnou při klinickém i histologickém hodnocení.



Obrázek 20 - Imunohistochemický průkaz buněk CD3+ a F4/80+ v sítnici u bezmikrobních a kontrolních myší 35. den po indukci



Graf 9 - Srovnání počtu CD3+ buněk ukazuje signifikantní nižší počet T lymfocytů u bezmikrobních myší oproti kontrolní skupině ($p < 0,05$) 35. den po indukci na řezech sítnicí po imunohistochemickém barvení. Čísla v závorkách jsou počty očí ve skupině. Mediány jsou zobrazeny červeně.

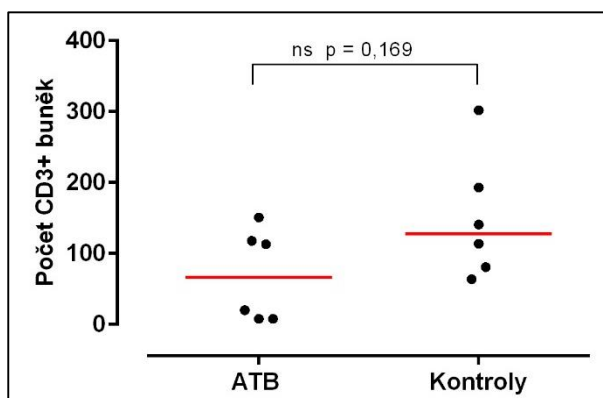


Graf 10 - Srovnání počtu F4/80+ buněk ukazuje nižší počet makrofágů u bezmikrobních myší oproti kontrolní skupině ($p = 0,093$) 35. den po indukci na řezech sítnicí po imunohistochemickém barvení. Čísla v závorkách jsou počty očí ve skupině. Mediány jsou zobrazeny červeně.

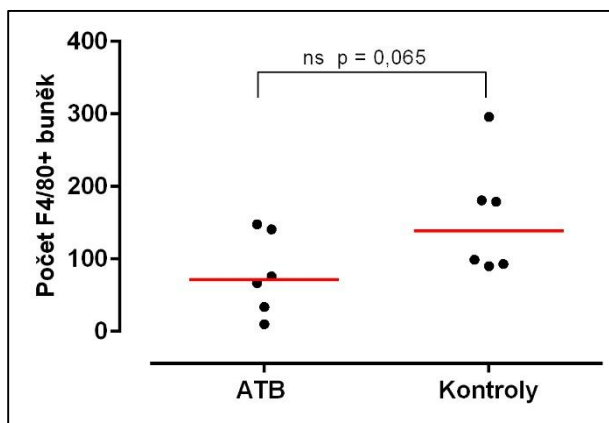
4.2.4.2 Myši léčené antibiotiky profylakticky (skupina B)

Oči myši léčených ATB týden před indukcí a kontrolních myši byly analyzovány imunohistochemicky se zaměřením na průkaz CD3+ buněk odpovídající T lymfocytům a F4/80+ buněk odpovídající makrofágům přítomným v sítnici 35. den po indukci EAU.

V sítnici léčených myši byl počet T lymfocytů i makrofágů nižší (graf 11; $p = 0,169$ a graf 12; $p = 0,065$). Nižší počet zánětlivých buněk v sítnici u myši léčených profylakticky ATB koreluje s nižší intenzitou uveitidy zjištěnou při klinickém i histologickém hodnocení.

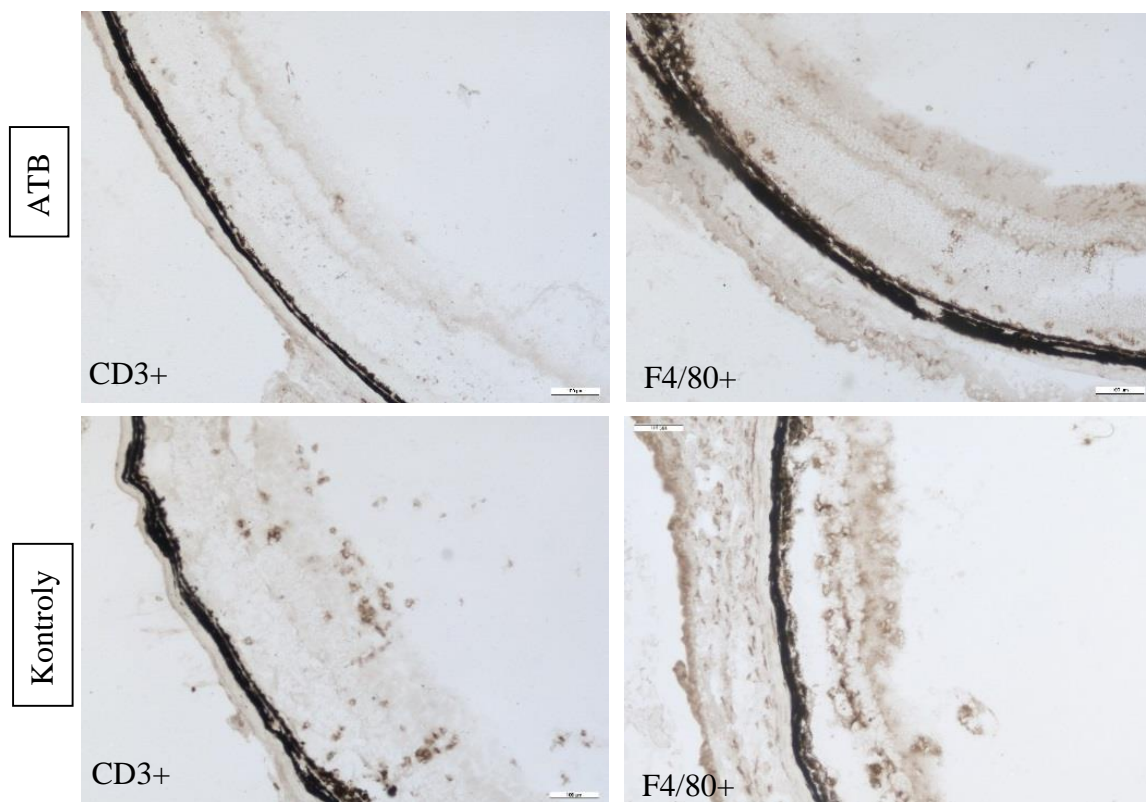


Graf 11 - Srovnání počtu CD3+ buněk (T lymfocytů) ukazuje nižší počet T lymfocytů u myši léčených ATB týden před indukcí oproti kontrolní skupině ($p = 0,169$) 35. den po indukci na řezech sítnicí po imunohistochemickém barvení. Mediány jsou zobrazeny červeně.



Graf 12 - Srovnání počtu F4/80+ buněk (makrofágů) ukazuje nižší počet makrofágů u myši léčených ATB týden před indukcí oproti kontrolní skupině ($p < 0,065$) 35. den po indukci na řezech sítnicí po imunohistochemickém barvení. Mediány jsou zobrazeny červeně.

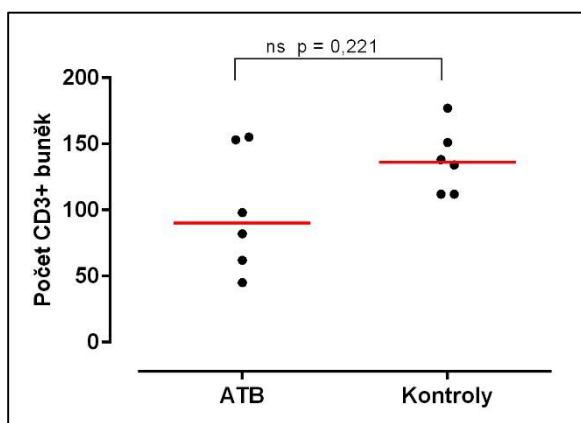
Nižší počet CD3+ a F4/80+ buněk u myši léčených profylakticky ATB oproti kontrolní skupině je patrný na snímcích imunohistochemického barvení (obrázek 21).



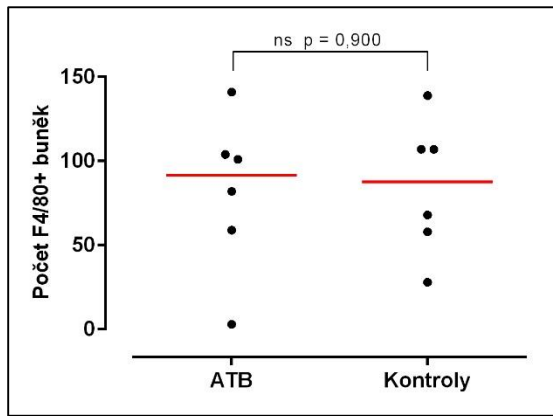
Obrázek 21 - Imunohistochemický průkaz buněk CD3+ a F4/80+ v sítnici u myší léčených ATB profylakticky a u kontrolních myší 35. den po indukci

4.2.4.3 Myši léčené antibiotiky ode dne indukce (skupina C)

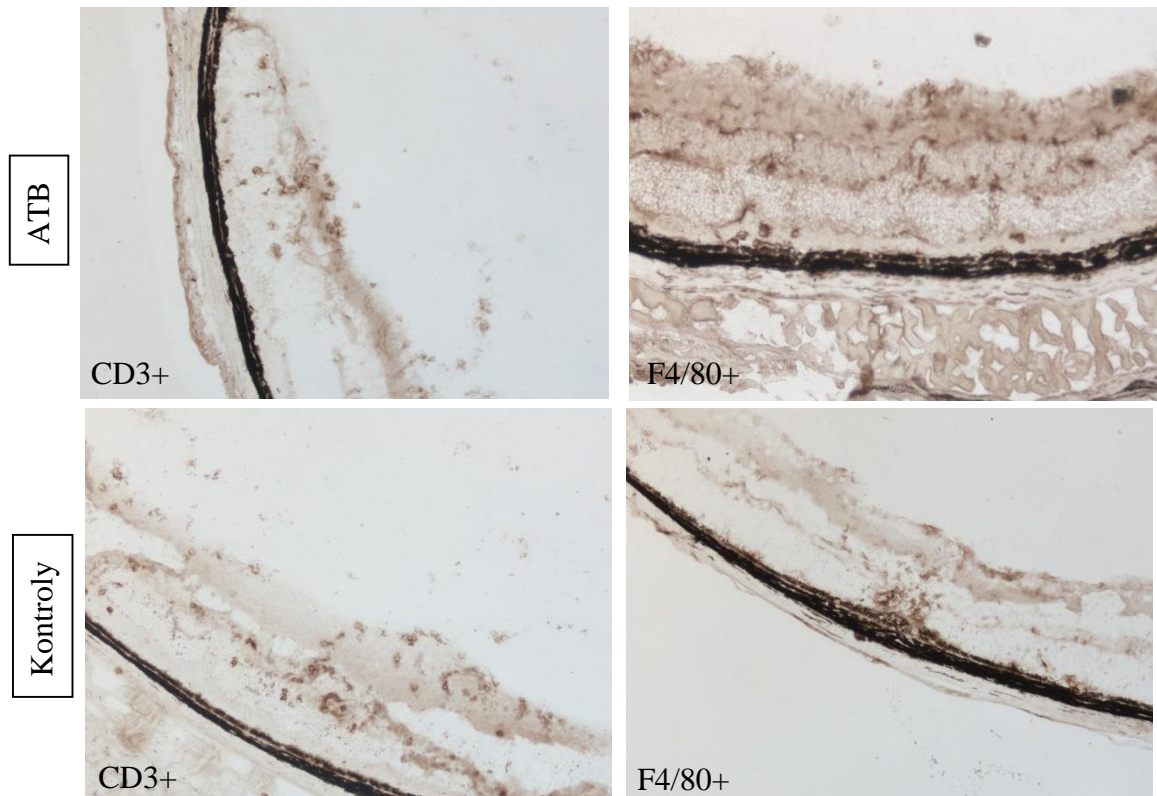
Oči myší léčených ATB ode dne indukce a kontrolních myší měly na řezech sítnici 35. den po indukci EAU po imunohistochemickém barvení srovnatelné počty CD3+ i F4/80+ buněk. Statisticky nevýznamný rozdíl je patrný z grafu 14 (CD3+, $p = 0,221$) a grafu 15 (F4/80+, $p = 0,900$) i fotografie imunohistochemického průkazu buněk (obrázek 22).



Graf 14 - Srovnání počtu CD3+ buněk (T lymfocytů) ukazuje srovnatelný počet T lymfocytů u myší léčených ATB ode dne indukce oproti kontrolní skupině ($p = 0,221$) 35. den po indukci na řezech sítnicí po imunohistochemickém barvení. Mediány jsou zobrazeny červeně.



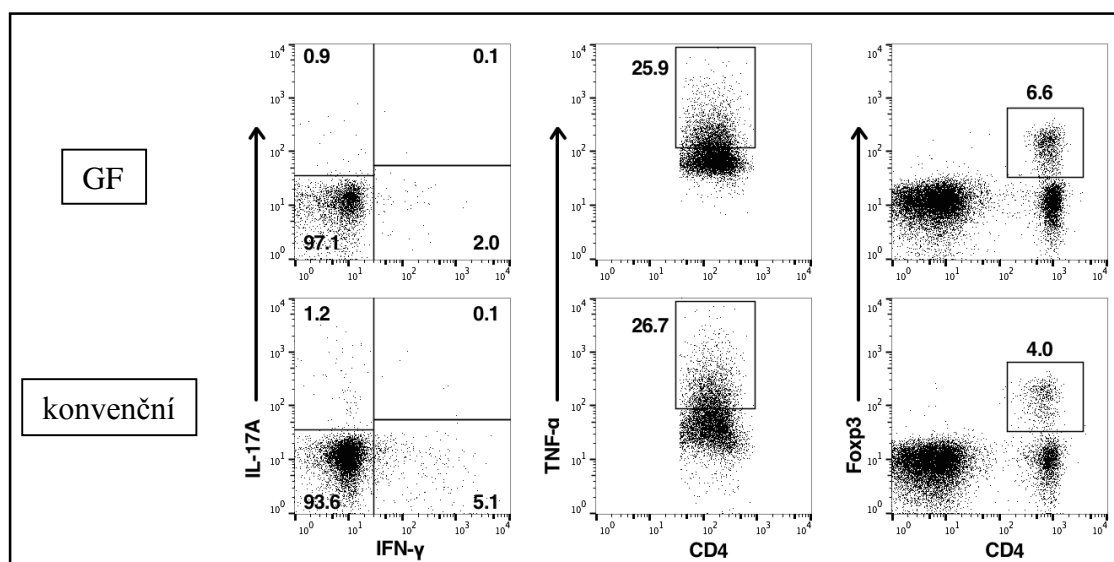
Graf 15 - Srovnání počtu F4/80+ buněk (makrofágů) ukazuje srovnatelný počet makrofágů u myší léčených ATB ode dne indukce oproti kontrolní skupině ($p = 0,900$) 35. den po indukci na řezech sítnici po imunohistochemickém barvení. Mediány jsou zobrazeny červeně.



Obrázek 22 - Imunohistochemický průkaz buněk CD3+ a F4/80+ v sítnici u myší léčených ATB ode dne indukce a u kontrolních myší 35. den po indukci

4.2.5 Průtoková cytometrie krčních a mezenteriálních mízních uzlin

Cílem bylo identifikovat populace buněk zodpovědných za průběh EAU. U konvenčních myši s EAU byla zaznamenána ve spádové krční uzlině větší akumulace Th1 a Th17 lymfocytů a nižší procento Foxp3+Tregs oproti GF myším (graf 16). Větší zásoba Th1 a Th17 lymfocytů u konvenčních myši je pravděpodobně výsledkem migrace buněk ze zánětlivé uveoretiny. Zastoupení CD4+TNF- α + T lymfocytů bylo podobné v obou skupinách. Vyšetření populace buněk v mezenteriálních lymfatických uzlinách neukázalo rozdíly mezi GF a konvenční skupinou myši. Tyto výsledky dokazují, že zvýšení prozánětlivých T lymfocytů ve spádové krční uzlině vzniká v důsledku orgánově specifického onemocnění oka.



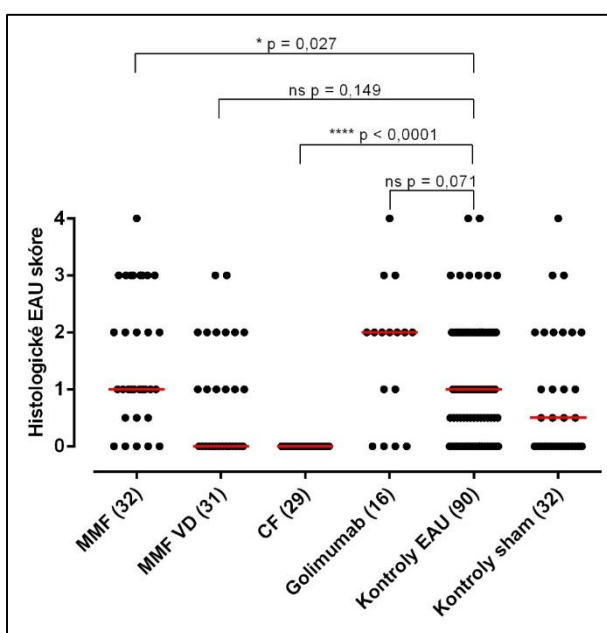
Graf 16 - Průtoková cytometrie krčních uzlin u GF a konvenčních myši
GF myši mají nižší počet prozánětlivých Th1 a Th17 lymfocytů a zvýšený počet T regulačních lymfocytů ve srovnání s konvenční skupinou myši.

Výsledky této práce byly podkladem publikace uvedené v příloze číslo 4.

4.3 Účinek imunomodulátorů na intenzitu zánětu

Jedním z cílů naší práce bylo posoudit vliv tří léků na intenzitu EAU. Zajímá nás účinek MMF vzhledem k účinku ověřeného imunosupresiva CF a vzhledem k monoklonální protilátce golimumabu.

Výsledky naší práce jsou shrnuty do grafu 17. Léčba CF představuje pozitivní kontrolu a z grafu vyplývá, že všechny oči v této skupině byly bez známek aktivity EAU. Tento výsledek byl vysoce signifikantní ($p < 0,0001$) ve srovnání se všemi kontrolními skupinami včetně sham kontroly.



Graf 17 - Účinnost léčby EAU

Srovnání stupně zánětu (EAU skóre) hodnoceného histologicky 35. den po indukci EAU u léčených a neléčených skupin. Červené linky představují mediány. Výsledky jsou zobrazeny jako ns (nesignifikantní), signifikantní výsledek je označen jako * ($p < 0,05$) a **** ($p < 0,0001$). Čísla v závorkách označují počty očí. VD je vyšší dávka MMF.

MMF byl aplikován ve dvou režimech dávkování. Nižší dávka (30 mg/kg) vedla ke statisticky signifikantnímu snížení zánětu ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolními skupinami, včetně sham kontroly. Vyšší dávka MMF 50 mg/kg snížila intenzitu zánětu (viz graf 17), ale výsledek nebyl statisticky signifikantní. Předpokládáme, že vyšší dávka MMF nedosáhla statistické významnosti v důsledku vysokého počtu očí v kontrolní skupině. MMF v obou dávkách byl u myši dobře tolerován, jako vedlejší účinek jsme pozorovali pouze ohraničenou ztrátu srsti.

Golimumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti TNF- α . Léčba golimumabem neprokázala účinek na snížení zánětu. Z histologického hodnocení je zřejmé, že golimumab způsobil spíše vyšší intenzitu zánětu, což můžeme vysvětlit jeho humánním původem.

Prokázali jsme signifikantní snížení nitroočního zánětu léčbou MMF a CF. Závěr naší práce podporuje indikaci léčby MMF u zadní uveitidy autoimunitní etiologie u lidí.

Tyto výsledky byly podkladem publikace v příloze číslo 1.

Kapitola 5

DISKUZE

5 DISKUZE

5.1 Experimentální model EAU

Experimentální modely autoimunitní uveitidy umožňují detailnější studium uveitid [Caspi et al., 1988; Xu et al., 2008; Caspi et al., 2008] a za posledních 40 let pomohly objasnit vliv genové výbavy na průběh nitroočního zánětu, zkoumat základní mechanismy patogeneze uveitid a testovat nové strategie imunologické léčby [Forrester et al., 1992; Klímová et al., 2014].

Experimentální autoimunitní uveitida u myši představuje reprodukovatelný model, který otevírá další možnosti v oblasti výzkumu zadní uveitidy autoimunitní etiologie. Uveitida indukovaná u myši kmene C57BL/6 je mírná a chronická a blízce připomíná autoimunitní uveitidu u lidí [Caspi, 2006]. Tím se liší od modelu akutní uveitidy u myši kmene B10.RIII, kde vzniká prudká krátkodobá panuveitida. Na tomto modelu je vrchol zánětu 12. až 15. den a není možné vyšetřit fundus biomikroskopicky pro zkalená optická média [Hirose et al., 1989].

Citlivost běžně používaného kmene myši C57BL/6 k sítnicovému peptidu (IRBP) je variabilní. Úspěch indukce ovlivňuje více faktorů, například pohlaví a stáří myši nebo podmínky chovu. Obvykle se pracuje se samicemi, a to vzhledem k vyšší prevalenci autoimunitních onemocnění u žen. Zatím nebyla publikována práce srovnávající u myši intenzitu zánětu EAU mezi pohlavím.

Intenzita vyvolaného zánětu hodnocená histologicky u myši kmene C57BL/6 kolísá mezi jednotlivými laboratořemi v závislosti na protokolu indukce uveitidy. Průměrně autoři uvádějí stupeň zánětu 1 až 2: Kim et al. [2014] 2,13, Xu et al. [2008] 1 až 2, Keino et al. [2004] 1,2, Kitamei et al. [2006] 1,63. V našich experimentech zaznameneáme při histologickém hodnocení průměrný stupeň zánětu 2.

Pozoruhodné je, že intenzita zánětu ve škále 0 až 4 zjištěná při klinickém vyšetření otoskopem 35. den po indukci je vyšší (stupeň 3) než při hodnocení histologickém [Xu et al., 2008], což potvrzuje také naše sledování. Tuto diskrepanci vysvětlíme například rozdílným rozsahem hodnocené sítnice. Při klinickém vyšetření přehlédneme celou sítnici. Při histologickém hodnocení posuzujeme 8 až 10 řezů sítnice jednoho oka silné 7 μm , nemusíme tedy všechny léze zachytit.

Výhodou modelu chronické EAU u myši C57BL/6 je relativně dlouhá doba aktivity zánětu trávající přibližně 3 až 4 týdny. Biomikroskopicky byla u našich myši nejvyšší intenzita zánětu 25. den po indukci. Histologicky byla největší kumulace zánětlivých změn 35. den po indukci. Naše pozorování korelují s výsledky jiných autorů, Xu et al. [2008] zaznamenává

vrchol zánětu kolem 25. dne po indukci, Caspi [1988] popisuje aktivní zánět od 3. do 7. týdne po indukci.

Postupný vývoj klinických a histologických projevů v našem pozorování odpovídá popisu v práci kolektivu autorů Xu et al. [2008]. V počátečních stádiích (14. den po indukci) je klinicky přítomný mírný edém terče zrakového nervu, na histologickém řezu je zrakový terč bez viditelných strukturních změn. Na vrcholu zánětu (25. den po indukci) je klinicky patrný výrazný edém terče zrakového nervu, opouzdření cév a bělavé lineární léze. Na histologických řezech tyto změny odpovídají infiltraci zrakového nervu zánětlivými buňkami, vaskulitidě a retinálním záhybům. V pozdním stádiu (60. den po indukci) dominují klinicky na sítnici jizvy, histologicky prokazujeme gliózu a ztrátu zevních segmentů fotoreceptorů.

Minimální či žádné postižení předního segmentu u našeho modelu je s výhodou, protože umožňuje při biomikroskopii dobrou vyšetřitelnost sítnice i při vysoké aktivitě zánětu.

5.2 Zánětlivé buňky v sítnici na modelu EAU u myši konvenčních a bezmikrobních

V průběhu zánětu dochází k infiltraci sítnice celou řadou imunokompetentních buněk: T a B lymfocyty, dendritické buňky, makrofágy, MDSC, neutrofilly. Nejpočetnějšími buňkami v sítnici jsou v průběhu celé doby zánětu CD4⁺ lymfocyty a makrofágy [Jiang et al., 1999], což odpovídá našim výsledkům imunohistochemického barvení. Iniciální fáze zánětlivého procesu se účastní zejména neutrofilly a makrofágy. Chronické fáze zánětu se účastní především lymfocyty a makrofágy.

Místo vstupu zánětlivých buněk do sítnice je stále nejasné. Některé práce předpokládají, že buňky vstupují do sítnice uveálními traktem, což podporuje přítomnost MHC II pozitivních dendritických buněk v uveálním traktu [McMenamin et al., 1993]. Nicméně jiné práce ukazují, že onemocnění může být zahájeno přestupem buněk z cév ve vnitřních vrstvách sítnice, kdy se CD4⁺ lymfocyty akumulují nejdříve v okolí cév a nejsou přítomné v jiných částech sítnice. V dalším průběhu se přesunou do sítnice, cíleně do vrstvy zevních segmentů fotoreceptorů, aktivované makrofágy rekrutované z krve [Jiang et al., 1999].

Ve tkáni dochází k vazodilataci, edému s nekrózou a/nebo proliferací, jejíž výsledkem je glióza nebo fibróza. Histologické nálezy v pozdní fázi EAU nesou podobné známky jako u lidí u sympatické oftalmie, Vogt-Koyanagi-Harada syndromu nebo Behçetovy nemoci. Mnohjaderné obrovské buňky s fagocytovaným pigmentem a hyperplazie RPE spolu s proliferací gliových buněk obsahujících fagocytovaný uveální pigment byly přítomny v atrofické sítnici u lidí i u modelu EAU [Jiang et al., 1999]. Stejně nálezy s gliózou a hyperplazií RPE jsme pozorovali na našich histologických řezech 60. den po indukci EAU.

Imunohistochemický průkaz buněk v sítnici v našem sledování protilátkou proti CD3 prokáže specificky přítomnost T lymfocytů. T lymfocyty jsou hlavními efektorovými buňkami imunitní reakce, což jsme ověřili kvantitativním rozбором CD3⁺ buněk ve tkáních experimentálních zvířat s EAU. Jsou základem granulomů u tohoto typu zánětu a jejich počet stoupá v čase od indukce. Oproti konvenčním kontrolám mají bezmikrobní myši v sítnici významně nižší počet T lymfocytů.

Průkaz F4/80⁺ buněk označí jak makrofágy, tak mikroglie a dendritické buňky. Makrofágy jsou nejednotnou skupinou buněk, proto k identifikaci samotných makrofágů je nutné znát fenotyp. Zánětlivé M1 makrofágy rekrutované z cirkulace exprimují antigeny CCL20, CCL15 a CXCL10. M2 rezidentní makrofágy mají funkci reparační [Forrester et al., 1990] a jejich biomarkery jsou CCL18, CCL22, ECF-L/YM1 a stabilin-1. Regulační makrofágy

mohou být identifikovány pomocí biomarkeru CCL1 nebo LIGHT. Naše experimenty potvrzují, že makrofágy jsou důležitou součástí imunitní odpovědi při EAU. Jsou morfologickou součástí granulomů v našem modelu a jejich počet ve tkáni stoupá v čase od indukce EAU. Vzhledem k nespecifitě námi používaného barvení nelze odlišit výše zmíněné různé typy makrofágů a jistě by bylo s výhodou fenotypizaci doplnit v rámci dalšího výzkumu.

Studie na potkanech ukázala, že aktivované makrofágy pocházející z krve jsou u EAU hlavními buňkami tkáňového poškození [Forrester et al., 1998; Jiang et al., 1999], které probíhá pod kontrolou antigenně specifických T lymfocytů a TNF- α [Dick et al., 1996]. Forrester et al. [1990] pozoroval, že při uveoretinitidě makrofágy fagocytují zevní segmenty fotoreceptorů, což odpovídá atrofii fotoreceptorů u pokročilého stupně EAU i na našem modelu EAU. Tkáňové poškození je také z části způsobeno volnými radikály, zejména oxidem dusnatým [Hoey et al., 1997]. Naším dalším cílem je do budoucna zaměřením na fenotypizaci makrofágů, detekci ILC a vlivu oxidu dusnatého na tkáňovém poškození v průběhu EAU.

Podle současných literárních údajů mikrobiota významně ovlivňuje zánětlivá onemocnění střeva [Pagliari et al., 2015] i celé řady jiných orgánů [Kverka a Tlaskalová-Hogenová, 2013; Bonamichi-Santos et al., 2015; Giorgetti et al., 2015]. Složení mikrobioty a jejího genomu (mikrobiom) a také interakce hostitel-mikrobiota jsou hlavními faktory určujícími typ a sílu slizniční imunitní odpovědi [Honda et al., 2012]. Přítomnost mikrobioty podmiňuje vznik zánětu u většiny zvířecích modelů autoimunitních onemocnění: kolitidy, RS, artritidy nebo ankylozující spondylitidy [Hudcovic et al., 2001; Lee et al., 2011]. Výjimkou je model typu 1 diabetu, kde absence mikrobioty jeho intenzitu zvyšuje [Wen et al., 2008]. Klinicky i experimentálně je popsán význam střevního mikrobiomu také u systémových onemocnění se známou asociací se zánětem, například metabolického syndromu a obezity, a to prostřednictvím aktivace inflamazomu a IL-1 [Tilg a Kaser, 2011; Esser et al., 2015].

Standardní model EAU IRBP-indukovaný s CFA je blízký autoimunitní uveitidě u lidí [Forrester et al., 2010]. Na tomto modelu redukované mikrobiální prostředí podle našich výsledků snižuje intenzitu uveitidy, a to u myší chovaných v bezmikrobních podmínkách i u myší z konvenčního chovu, které byly profylakticky léčeny širokospektrými antibiotiky (metronidazol a ciprofloxacin) týden před indukcí EAU a po dobu experimentu.

Pokud byla u konvenčních myší léčba antibiotiky zahájena v den aplikace antigenního peptidu a adjuvans, neměla léčba antibiotiky vliv na intenzitu EAU. Tyto výsledky mohou mít význam v humánní medicíně, kde vysvětlují minimální vliv podávaných systémových antibiotik při terapii autoimunitní uveitidy [Preisová, 1952].

V našich experimentech jsou T lymfocyty nejvíce zastoupenou skupinou buněk infiltrující sítnici. Podle výsledků průtokové cytometrie u GF myši se ve spádové krční lymfatické uzlině nachází méně IFN- γ a IL-17 pozitivních T lymfocytů, přestože v mezenteriální uzlině je koncentrace buněk Th1 a Th17 u GF i konvenčních myši stejná. Proto se domníváme, že u CFA modelu EAU jsou antigen specifické Th1 a Th17 lymfocyty aktivovány v drénující lymfatické uzlině v blízkosti oka a dále vycestují do tkání včetně střeva, kdy je střevní mikrobiom aktivuje spíše náhodně. Vyšší počty Treg buněk v krčních uzlinách GF myši, ale ne v mezenteriálních uzlinách naznačují, že buňky jsou do místa zánětu přitahovány a mohou regulovat lokální imunitní odpověď.

Z výsledků imunohistochemie bylo zjištěno, že GF myši mají signifikantně nižší počet CD3+ lymfocytů. Snížení počtu F4/80+ makrofágů nebylo signifikantní. Tato data potvrzují, že čím je v sítnici nižší počet T lymfocytů, tím je intenzita uveitidy nižší. Není však zcela zřejmé, zda snížení počtu T lymfocytů je příčinou či důsledkem nižší intenzity zánětu.

K vyvolání EAU je nezbytná aktivace vrozené imunity prostřednictvím adjuvans. Výsledky naší práce u bezmikrobních myši i myši po aplikaci profylaktických antibiotik ukazují, že aktivace vrozené imunity je podpořena střevním mikrobiomem. Je zřejmé, že aktivace vrozené imunity je nezbytná pro indukci EAU. Nicméně jakým mechanismem přesně rezidentní lymfoidní buňky ve střevě ovlivňují systémově reaktivitu proti vlastní tkáni a zvyšují dispozici k autoimunitním onemocněním, není přes intenzivní výzkum zatím známé.

5.4 Léčba autoimunitní uveitidy

Uveitida je zrak ohrožující onemocnění, které je terapeuticky náročné ovlivnit. Imunosupresiva ani biologická léčba nemusí být vždy u pacientů s autoimunitní uveitidou účinná. Pro léčbu existuje více léčebných režimů.

V naší práci jsme testovali na myším modelu EAU účinek MMF vzhledem k ověřenému cytostatiku CF a vzhledem ke golimumabu, který nebyl u zvířecích modelů testován pro jeho humanizovanou strukturu.

Cílem naší studie bylo vyhodnotit účinek MMF na uveitidu na myším modelu EAU. V každodenní praxi má MMF své místo v nabídce imunosupresiv a pro některé typy uveitid je doporučený. Hlavní role MMF je spíše podpůrná a jeho účinek v monoterapii u zrak ohrožujících uveitid je více než sporný. Proto jsme testovali účinek MMF na modelu experimentální uveitidy. V minulosti byl MMF používán na modelu EAU u potkanů Lewis, u kterých byla EAU indukována boviním S-antigenem [Chanaud et al., 1995; Dick et al., 1998]. Potkani dostávali MMF sondou v dávce 30 mg/kg/den v den 0 až 13 od imunizace, což významně potlačilo zánět a oddálilo jeho nástup. Dick et al. [1998] také imunizoval potkany Lewis boviním antigenem, MMF byl aplikován žaludeční sondou v dávce 30 mg/kg/den v den 7 až 20. Potkani vykazovaly pozdější nástup onemocnění a nižší stupeň zánětu (1,38) ve srovnání s kontrolní skupinou (3,4). Histologie sítnice ukázala zachované zevní segmenty fotoreceptorů u potkanů léčených MMF. Publikace zabývající se aplikací MMF u myší nejsou k dispozici.

V naší studii bylo použito dvojí dávkování MMF, dávka 30 mg/kg (více reflektuje dávkování u lidí) a vyšší dávka 50 mg/kg. Nižší dávka MMF potlačila experimentální uveitidu na statisticky signifikantní hodnotu ($p < 0,05$) oproti skupině sham léčených myší s EAU a neléčených myší s EAU. U vyšší dávky MMF nebylo dosaženo statistické významnosti, pravděpodobně kvůli srovnání s vysokým počtem kontrol (31 očí s MMF 50 mg/kg oproti 90 očím s EAU).

Suzuki et al. [1989] vyzoroval, že u potkanů aplikace CF den před imunizací významně potlačí rozvoj EAU. Naše výsledky u myší tato pozorování potvrzují, tj. že CF v dávce 100 mg/kg zcela potlačí rozvoj onemocnění.

V naší práci jsme prokázali signifikantní snížení očního zánětu léčbou MMF a CF. Závěr naší práce podporuje indikaci léčby MMF u zadní uveitidy autoimunitní etiologie u lidí.

Golimumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti TNF- α . Publikace zabývající se použitím golimumabu u zvířecího modelu EAU nejsou dostupné, jelikož tato léčba nemá

na hlodavce vliv vzhledem ke své humánní struktuře. Naše výsledky ukazují zhoršení uveitidy v léčené skupině. Zvýšení prozánětlivého účinku golimumabu může být vysvětleno aplikací plně humanizované protilátky myším, což vyvolá silnou imunitní reakci.

Všechny dosud dostupné léky jsou pouze symptomatické a neléčí příčinu poruchy autotolerance. Cílem je najít léčbu zaměřenou na specifické efektorové T lymfocyty nesoucí retinální antigen, který uveitidu vyvolal. Přibývá seznam známých sítnicových proteinů vyvolávajících uveitidu u lidí, ale je třeba znát vazby s HLA a antigenní specifitu epitopů, aby mohly být zlepšeny efektivní antigen-specifické přístupy v diagnóze a léčbě [Caspi, 2010].

Kapitola 6

ZÁVĚR

6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala částí rozsáhlé problematiky IRBP-indukovaného nitroočního zánětu na myším modelu EAU a splnila cíle stanovené v úvodu této dizertační práce:

I. V naší laboratoři byl zaveden reprodukovatelný a stabilní myší model EAU indukovaný u myší kmene C57BL/6J sítnicovým antigenem IRBP 1-20. Klinicky byly myši vyšetřovány *in vivo* pomocí otoskopu, byly zdokumentovány klinické projevy uveitidy: sítnicové infiltráty, edém terče zrakového nervu a opouzdření cév. Histologicky byly hodnoceny zánětlivé změny *post mortem* 35. den po indukci: retinální zánětlivá ložiska, retinální záhyby, neovaskularizace sítnice, serózní amoce, vaskulitida a vitritida. Intenzita zánětu byla posuzována pomocí zavedených hodnotících tabulek ve škále 0 (žádný zánět) až 4 (silný zánět).

A) Byla zjištěna kritická místa v protokolu indukce, zpřesněna příprava reagensů a detailně popsána aplikace peptidu, což jsou zásadní předpoklady pro úspěšnou indukci uveitidy. Důležité faktory ovlivňující indukci jsou věk a pohlaví u myší, vhodné podmínky chovu a také mikrobiální prostředí.

B) Podle našich pozorování je při klinickém vyšetření vrchol zánětu 25. den po indukci, při histologickém vyšetření až 35. den. Pokud posuzujeme intenzitu zánětu 35. den po indukci, je při klinickém vyšetření vyšší (stupeň 3) než při hodnocení histologickém (stupeň 2). Tyto diskrepance mohou být vysvětleny rozdílným rozsahem hodnocené sítnice. Při klinickém vyšetření je přehlédnuta celá sítnice. Při histologickém hodnocení je posuzováno 8 až 10 řezů sítnice jednoho oka, nemusí být tedy zachyceny všechny léze. V dalším průběhu nastupují atrofické pozánětlivé změny, které zaznamenáme dříve při klinickém vyšetření.

II. Na IRBP-indukovaném modelu EAU u myší kmene C57BL/6J byly imunohistochemicky detekovány CD3+ T lymfocyty a F4/80+ makrofágy v sítnici. V průběhu zánětu se jejich počet prudce zvyšuje 25. den od indukce, v dalším průběhu do ukončení experimentu 60. den je vzestup pomalejší. Výrazné zvýšení počtu těchto zánětlivých buněk časově koreluje s vrcholem zánětu. T lymfocyty jsou zachyceny v sítnici od 10. dne po indukci, makrofágy se vyskytují v sítnici od 20. dne po indukci. Celkově je počet T lymfocytů 2x vyšší

než počet makrofágů. Charakteristické je uspořádání zánětlivých ložisek s T lymfocyty v centru a makrofágy na periferii ložiska.

III. V celé řadě experimentálních modelů autoimunitních onemocnění bylo prokázáno, že v bezmikrobních podmínkách nedochází k rozvoji onemocnění nebo je jeho průběh atenuován. V této práci bylo potvrzeno, že redukované mikrobiální prostředí před indukcí EAU (bezmikrobní myši a myši léčené profylakticky antibiotiky týden před indukcí) vede k nižší intenzitě EAU, zatímco antibiotika zahájena konkomitantně s indukcí neovlivňují intenzitu uveitidy. Kvantitativní analýza T lymfocytů a makrofágů v sítnici u bezmikrobních myši prokázala signifikantně nižší počet T lymfocytů, což potvrzuje, že čím je v sítnici nižší počet T lymfocytů, tím je intenzita uveitidy nižší.

Tato studie dokazuje blízký vztah mezi mikrobiomem a EAU a potvrzuje vliv nespecifické imunity na vznik EAU.

IV. CF v dávce 100 mg/kg a MMF v dávce 30 mg/kg signifikantně snižují intenzitu zánětu na IRBP-indukovaném modelu EAU. CF je zavedené imunosupresivum s prokázaným účinkem, užití MMF bylo dosud u autoimunitních uveitid rozporuplné. Signifikantní výsledek v našem pozorování podporuje použití MMF v léčbě zadní uveitidy autoimunitní etiologie v humánní medicíně.

Zavedení modelu EAU umožňuje podrobně studovat imunopatogenetické mechanismy zánětu a jejich cílenou regulaci, což může přispět k efektivní léčbě nitroočních zánětů autoimunitní etiologie v humánní medicíně. Nové terapeutické možnosti mohou vést ke snížení nákladů na léčbu uveitidy a jejich komplikací a ke snížení procenta slepoty u osob v produktivním věku.

Kapitola 7

LITERATURA

7 LITERATURA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2014) Basic immunology, Elsevier Saunders, ISBN 978-1-4557-0707-2: 93-115 a 171-187.

Agarwal R.K., Silver P.B., Caspi R.R. (2012). Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Autoimmunity: Methods and Protocols*, Methods in molecular biology, vol. 900, Springer Science+Business Media New York, Chapter 22: 443-469.

Avichezer D., Silver P.B., Chan C.C., Wiggert B., Caspi R.R. (2000). Identification of a new epitope of human IRBP that induces autoimmune uveoretinitis in mice of the H-2b haplotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 127-131.

Bernard C.C., Carnegie P.R. (1975). Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins. *J Immunol.* 114: 1537–1540.

Biswas A., Wilmanski J., Forsman H., Hrnčir T., Hao L., Tlaskalova-Hogenova H., Kobayashi K.S. (2011) Negative regulation of Toll-like receptor signaling plays an essential role in homeostasis of the intestine. *Eur J Immunol.* 41: 182-194.

Blank M., Barzilai O., Shoenfeld Y. (2007) Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 32: 111-118.

Bonamichi-Santos R., Aun M. V., Agondi R. C., Kalil J., Giavina-Bianci P. (2015) Microbiome and Asthma: What Have Experimental Models Already Taught Us? *J Immunol Res.* 2015: 614758.

Broderick C., Hoek R.M., Forrester J.V., Liversidge J., Sedgwick J.D., Dick A.D. (2002) Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol.* 161: 1669-1677.

Caspi R.R., Roberge F.G., McAllister C.G., el Saied M., Kuwabara T., Gery I., Hanna E., Nussenblatt R.B. (1986) T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol.* 136: 928–933.

Caspi RR, Roberge FG, Nussenblatt RB. (1987) Organ-resident, nonlymphoid cells suppress proliferation of autoimmune T lymphocytes. *Science.* 237: 1029–1032.

Caspi R.R., Roberge F.G., Chan C.C., Wiggert B., Chader G.J., Rozenszajn L.A., Lando Z., Nussenblatt R.B. (1988). A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol.* 140: 1490-1495.

Caspi R.R., Chan C.C., Wiggert B., Chader G.J. (1990a) The mouse as a model of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Curr Eye Res.* 9 (Suppl.): 169-174.

Caspi R.R., Chan C.C., Leake W.C., Higuchi M., Wiggert B., Chader G.J. (1990b) Experimental autoimmune uveoretinitis in mice. Induction by a single eliciting event and dependence on quantitative parameters of immunization. *J Autoimmun.* 3: 237-246.

Caspi R.R., Grubbs BG, Chan CC, Chader GJ, Wiggert B (1992) Genetic control of susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the mouse model. Concomitant regulation by MHC and non-MHC genes. *J Immunol.* 148: 2384-2389.

Caspi R. R.: Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis. (2006) *Drug Discovery Today: Disease Models.* 3: 3-9.

Caspi R. R., Silver P. B., Luger D., Tanq J., Cortes L.M., Pennesi G., Mattapallil M.J., Chan C.C. (2008) Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res.* 40: 169-174.

Caspi R.R. (2010) A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest.* 120: 3073-3083.

Caspi R.R. (2013) Immunology of the eye-inside and out. *Int Rev Immunol.* 32: 1-3.

Caspi R.R. (2014) Understanding autoimmunity in the eye: from animal models to novel therapies. *Discov Med.* 17: 155-162.

Chan C. C., Caspi R. R., Ni M., Leake W.C., Wiggert B., Chader G.J., Nussenblatt R.B. (1990) Pathology of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Autoimmun.* 3: 247-255.

Chanaud N.P., Vistica B.P., Eugui E., Nussenblatt R.B., Allison A.C., Gery I. (1995) Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by mycophenolate mofetil, an inhibitor of purine metabolism. *Exp Eye Res.* 61: 429-434.

Copland D.A., Wertheim M.S., Armitage W.J., Nicholson L.B., Raveney B.J., Dick A.D. (2008) The clinical time-course of experimental autoimmune uveoretinitis using topical endoscopic fundal imaging with histologic and cellular infiltrate correlation. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 49: 5458-5465.

Daniel E., Thorne J.E., Newcomb C.W., Pujari S.S., Kaçmaz R.O., Levy-Clarke G.A., Nussenblatt R.B., Rosenbaum J.T., Suhler E.B., Foster C.S., Jabs D.A., Kempen J.H. (2010) Mycophenolate mofetil for ocular inflammation. *Am J Ophthalmol.* 149: 423-432.

de Kozak Y., Sakai J., Thillaye B., Faure J.P (1981) S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. *Curr Eye Res.* 1: 327-337.

Denou E., Lolmède K., Garidou L., Pomie C., Chabo C., Lau T.C., Fullerton M.D., Nigro G., Zakaroff-Girard A., Luche E., Garret C., Serino M., Amar J., Courtney M., Cavallari J.F., Henriksbo B.D., Barra N.G., Foley K.P., McPhee J.B., Duggan B.M., O'Neill H.M., Lee A.J., Sansonetti P., Ashkar A.A., Khan W.I., Surette M.G., Bouloumié A., Steinberg G.R., Burcelin R., Schertzer J.D. (2015) Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. *EMBO Mol Med.* 7: 259-274.

Dick A.D., Cheng Y.F., Liversidge J., Forrester J.V. (1994) Immunomodulation of experimental autoimmune uveoretinitis: a model of tolerance induction with retinal antigens. *Eye (Lond).* 8: 52-59.

Dick A.D., McMenamon P.G., Körner H., Scallan B.J., Ghraheb J., Forrester J.V., Sedgwick J.D. (1996) Inhibition of tumor necrosis factor activity minimalizes target organ damage in experimental autoimmune uveoretinitis despite quantitatively normal activated T cell traffic to the retina. *Eur J Immunol.* 26: 1018-1025.

Dick A.D., Kreutzer B., Laliotou B, Forrester J.V. (1998) Effects of mycophenolate mofetil on nasal mucosal tolerance induction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39: 835-840.

Doycheva D., Zierhut M., Blumenstock G., Stuebiger N, Deuter C. (2011) Long-term results of therapy with mycophenolate mofetil in chronic non-infectious uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 249: 1235-1243.

Durrani O.M., Meads C.A., Murray P.I. (2004) Uveitis: a potentially blinding disease. *Ophthalmologica.* 218: 223-236.

Eberl G., Colonna M., Di Santo J.P., McKenzie A.N.J. (2015) Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science.* 348: aaa6566. doi: 10.1126/science.aaa6566.

Esser N., Paquot N., Scheen A.J. (2015) Inflammatory markers and cardiometabolic diseases. *Acta Clin Belg.* 70: 193-199.

Forrester J. V., Worgul B. V., Merriam G. R., Jr. (1980) Endotoxin-induced uveitis in the rat. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 213: 221-233.

Forrester J.V., Huitinga I., Lumsden I., Dijkstra C.D. (1998) Marrow-derived activated macrophages are required during the effector phase of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Curr Eye Res.* 17: 426-473.

Forrester J. V., Xu H., Kuffová L., Dick A.D., McMenamin P.G. (2010) Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev.* 234: 282-304.

Forrester J.V., Liversidge J., Dua H.S., Towler H., McMenamin P.G. (1990) Comparison of clinical and experimental uveitis. *Curr Eye Res.* 9 (Suppl.): 75-84.

Forrester J.V., Liversidge J., Dua H.S., Dick A., Harper F., McMenemy P.G. (1992) Experimental autoimmune uveoretinitis: a model system for immunointervention: a review. *Curr Eye Res.* 11 (Suppl.): 33-40.

Forrester J.V., Xu H. (2012) Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol.* 27: 338.

Forrester J.V., Dick A.D., McMenemy P.G., Roberts F., Pearlman E. (2015) The eye. Basic sciences in practice, 4th edition, Saunders Elsevier, ISBN: 978-0-7020-5554-6.

Gayathri D., Chen M., Muckersie E., Xu H. (2014) Culture and characterization of microglia from adult murine retina. *Scientific World Journal.* doi: 10.1155/2014/894368.

Gery I., Strelein J.W. (1994) Autoimmunity in the eye and its regulation. *Curr Opin Immunol.* 6: 938-945.

Giorgetti G., Brandimarte G., Fabiocchi F., Ricci S., Flamini P., Sandri G., Trotta M.C., Elisei W., Penna A., Lecca P.G., Picchio M., Tursi A. (2015) Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *J Immunol Res.* 2015: 501361.

Greenwood J. (1992) The blood-retinal barrier in experimental autoimmune uveitis (EAU): a review. *Curr Eye Res.* 11 (Suppl): 25-32.

Hirose S., Singh V. K., Donoso L. A., Shinohara T., Kotake S., Tanaka T., Kuwabara T., Yamaki K., Gery I., Nussenblatt R.B. (1989) An 18-mer peptide derived from the retinal S antigen induces uveitis and pinealitis in primates. *Clin Exp Immunol.* 77: 106-111.

Hoey S., Grabowski P.S., Ralston S.H., Forrester J.V., Liversidge J. (1997) Nitric oxide accelerates the onset and increases the severity of experimental autoimmune uveoretinitis through an IFN- γ -dependent mechanism. (1997) *J Immunol.* 159: 5132-5142.

Honda K., Littman D.R. (2012) The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol,* 30: 759-795.

Hooper P., Bora N.S., Kaplan H.J., et al. (1991) Inhibition of lymphocyte proliferation by resident ocular cells. *Curr Eye Res.* 10: 363–372.

Horai R., Zárate-Bladés C.R., Dillenburg-Pilla P., Chen J., Kielczewski J.L., Silver P.B., Jittayasothorn Y., Chan C.C., Yamane H., Honda K., Caspi R.R. (2015) Microbiota-Dependent Activation of an Autoreactive T Cell Receptor Provokes Autoimmunity in an Immunologically Privileged Site. *Immunity.* 43: 343-353.

Horai R., Zárate-Bladés C.R., Dillenburg-Pilla P., Chen J., Kielczewski J.L., Silver P.B., Jittayasothorn Y., Chan C.C., Yamane H., Honda K., Caspi R.R. (2015) Microbiota-dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site. *Immunity.* 43: 343-345.

Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R. (2013) *Základy imunologie*, 5. vydání. Praha: Triton, ISBN 978-80-7387-713-2.

Hrcir T., Stepankova R., Kozakova H., Hudcovic T., Tlaskalova-Hogenova H. (2008) Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC Immunol.* 9: 65.

Hu L.H., Sanui H., Wiggert B., Redmond T.M., Chan C.C., Chader G.J., Gery I. (1990) Serial adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31: 1409–1412.

Hudcovic T., Stěpánková R., Cebra J., Tlaskalová-Hogenová H. (2001) The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice,” *Folia Microbiol (Praha).* 46: 565-572.

Jabs D.A., Nussenblatt R.B., Rosenbaum J.T. (2005) Standardization of uveitis nomenclature (SUN) Working Group. *Am J Ophthalmol.* 140: 509-516.

Jones M., Cordell J.L., Beyers A.D., Tse A.G.D., Mason D.Y. (1993). Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive antipeptide antibodies. *J Immunol.* 150: 5429-5435.

Jiang H.R., Lumsden L., Forrester J.V. (1999) Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10RIII mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 3177–3185.

Keino H., Kezuka T., Takeuchi M., Yamakawa N., Hattori T., Usui M. (2004) Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by vasoactive intestinal peptide. *Arch Ophthalmol.* 122: 1179-1184.

Khan I.J., Barry R.J., Amisshah-Arthur K.N., Carruthers D., Elamanchi S.R., Situnayake D., Murray P.I., Denniston A.K., Rauz S. (2013) Ten-year experience of pulsed intravenous cyclophosphamide and methylprednisolone protocol (PICM protocol) in severe ocular inflammatory disease. *Br J Ophthalmol.* 97: 1118-1122.

Kim T.W., Jeong H.J., Lee H.J., Ryu J.S., Wee W.R., Heo J.W., Kim M.K. (2014) Intraperitoneal infusion of mesenchymal stem/stromal cells prevents experimental autoimmune uveitis in mice. *Mediators Inflamm.* 2014: 624-640.

Kitamei H., Kitaichi N., Yoshida K., Nakai A., Fujimoto M., Kitamura M., Iwabuchi K., Miyazaki A., Namba K., Ohno S., Onoé K. (2006) Association of heat shock protein 70 induction and the amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Immunobiology.* 212: 11-18.

Klimesova K, Kverka M, Zakostelska Z, Hudcovic T, Hrnecir T, Stepankova R, Rossmann P, Ridl J, Kostovcik M, Mrazek J, Kopecny J, Kobayashi KS, Tlaskalova-Hogenova H. (2013) Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis.* 19: 1266-1277.

Klímová A., Seidler Štangová P., Heissigerová J., Svozílková P., Kučera T. (2014) Mycophenolate mofetil and cyclophosphamide treatments suppress inflammation intensity in an experimental model of autoimmune uveitis. *Folia Biologica*, 60: 228-234.

Kuchynka P. a kol. (2007) Oční lékařství, Grada Publishing, a.s., ISBN 978-80-247-1163-8, 428-477.

M. Kverka, H. Tlaskalova-Hogenova (2013) Two faces of microbiota in inflammatory and autoimmune diseases: triggers and drugs. *APMIS*, vol. 121: 403-21.

Lalivie dE-Z. (1968) [Experimental uveitis in the rat after subcutaneous injection of Freund's adjuvant. Histological changes in the uvea] *Ophthalmologica*. 155: 271-289.

Lambe T., Leung J.C., Ferry H., Bouriez-Jones T., Makinen K., Crockford T.L., Jiang H.R., Nickerson J.M., Peltonen L., Forrester J.V., Cornall R.J. (2007) Limited peripheral T cell anergy predisposes to retinal autoimmunity. *J Immunol*.178: 4276-4283.

Lee Y.K., Menezes J.S., Umesaki Y., Mazmanian S.K. (2011) Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108 (Suppl 1): 4615-4622.

Maatta J.A., Nygardas P.T., Hinkkanen A.E. (2000) Enhancement of experimental autoimmune encephalomyelitis severity by ultrasound emulsification of antigen/adjuvant in distinct strains of mice. *Scand J Immunol*. 51: 87–90.

Madeira M.H., Elvas F., Boia R., Gonçalves F.Q., Cunha R.A., Ambrósio A.F., Santiago A.R. (2015). Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators Inflamm*. 2015: 673090.

McMenamin P.G., Broekhuysse R.M., Forrester J.V. (1993) Ultrastructural pathology of experimental autoimmune uveitis: a review. *Micron*. 24: 521.

Miserocchi E., Modorati G., Pontikaki I., Meroni P.L., Geroloni V. (2013) Long-term treatment with golimumab for severe uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 22: 90-95.

Mochizuki M., Nussenblatt R.B., Kuwabara T., Gery I. (1985) Effects of cyclosporine and other immunosuppressive drugs on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26: 226-232.

Nakamura Y., Metea C., Gruner H., Asquith M., Planck S.R., Rosenbaum J.T. (2014) Altering the gut microbiota ameliorates experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55: 2497.

Pagliari D., Piccirillo C. A., Larbi A., Cianci R. (2015) The Interactions between Innate Immunity and Microbiota in Gastrointestinal Diseases. *J Immunol Res*, vol. 2015: 898297.

Paques M., Guyomard J.L., Simonutti M., Roux J.M., Picaud S., Le-Gargasson J.F., Sahel J.A. (2007) Panretinal, high resolution color photography of the mouse fundus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 2769-2774.

Preisová J. (1952) Léčba sympatické oftalmie penicilinem. *Česká Oftalmologie.* 8: 151-157.

Pawate S., Sriram S. (2010) The role of infections in the pathogenesis and course of multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol.* 13: 80-86.

Roberge FG, Caspi RR, Nussenblatt RB. (1988) Glial retinal Muller cells produce IL-1 activity and have a dual effect on autoimmune T-helper lymphocytes. Antigen presentation manifested after removal of suppressive activity. *J Immunol.* 140: 2193–2196.

Říhová a kol. (2009) Uveitidy. Praha: Grada Publishing, a.s., ISBN 978-80-247-2897-1.

Shao H., Liao T., Ke Y., Shi H., Kaplan H.J., Sun D. (2006) Severe chronic experimental autoimmune uveitis (EAU) of the C57BL/6 mouse induced by adoptive transfer of IRBP1-20-specific T cells. *Exp Eye Res.* 82: 323–331.

Saiga H., Shimada Y., Takeda K. (2011) Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin Dev Immunol.* 2011: 347594.

- Siepmann K., Huber M., Stübiger N., Deuter C., Zierhut M. (2006) Mycophenolate mofetil is a highly effective and safe immunosuppressive agent for the treatment of uveitis: a retrospective analysis of 106 patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 244: 788-794.
- Silver P.B., Chan C.C., Wiggert B., Caspi R.R. (1999) The requirement for pertussis to induce EAU is strain-dependent: B10.RIII, but not B10.A mice, develop EAU and Th1 responses to IRBP without pertussis treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 2898–2905.
- Sladká J. (2013) Mikrobiom - stále ještě nerozluštěná šifra. *Lékařské listy.* 1: 23-34.
- Streilein J.W., Cousins S.W. (1990) Aqueous humor factors and their effect on the immune response in the anterior chamber. *Curr Eye Res.* 9: 175-182.
- Stromnes I.M., Goverman J.M. (2006) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis, *Nature Protocols*, 1: 1810-1819.
- Suelves A.M., Arcinue C.A., González-Martin J.M., Kruh J.N., Foster C.S. (2013) Analysis of a novel protocol of pulsed intravenous cyclophosphamide for recalcitrant or severe ocular inflammatory disease. *Ophthalmology.* 120: 1201-1209.
- Suttorp-Schulten M.S., Rothova A. (1996) The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey. *Br J Ophthalmol.* 80: 844-848.
- Suzuki I., Takahashi S., Fujii Y., Fuyama S., Arai S. (1989) Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in rats: isolation of S-antigen, EAU susceptibility of rat strains, genetic control of EAU induction, and effects of cyclophosphamide and irritation on EAU. *Jpn J Ophthalmol.* 33: 13-26.
- Teoh S.C., Hogan A.C., Dick A.D., Lee R.W. (2008) Mycophenolate mofetil for the treatment of uveitis. *Am J Ophthalmol.* 146: 752-760.
- Thurau S.R., Chan C.C., Nussenblatt R.B., Caspi R.R. (1997) Oral tolerance in a murine model of relapsing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU): induction of protective tolerance in primed animals. *Clin Exp Immunol.* 109: 370-376.

Tilg H., Kaser A. (2011) Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest.* 121: 2126-2132.

Tlaskalová-Hogenová H., Stěpánková R., Kozáková H., Hudcovic T., Vannucci L., Tučková L., Rossmann P., Hrnčíř T., Kverka M., Zákostelská Z., Klimešová K., Příbylová J., Bártová J., Sanchez D., Fundová P., Borovská D., Srůtková D., Zídek Z., Schwarzer M., Drastich P., Funda D.P. (2011) The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 8: 110-120.

Tu Z., Li Y., Smith D., Doller C., Sugita S., Chan C.C., Qian S., Fung J., Caspi R.R., Lu L., Lin F. (2012) Myeloid suppressor cells induced by retinal pigment epithelial cells inhibit autoreactive T-cell responses that lead to experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53: 959-966.

Tubo N.J., Pagan A.J., Taylor J.J., Nelson R.W., Linehan J.L., Ertelt J.M., Huseby E.S., Way S.S., Jenkins M.K. (2013) Single naive CD4+ cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell.* 153: 785-796.

Van Eden W., Wick G., Albani S., Cohen I. (2007) Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann N.Y. Acad Sci.* 1113: 217-237.

Wacker W. B., Kalsow C. M. (1973) Autoimmune uveo-retinitis in the rat sensitized with retina photoreceptor cell antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 45: 582-592.

Wen L., Ley R. E., Volchkov P. Y., Stranges P.B., Avanesyan L., Stonebraker A.C., Hu C., Wong F.S., Szot G.L., Bluestone J.A., Gordon J.I., Chervonsky A.V. (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 455: 1109-1113.

Whitehouse M. (2012). Oily adjuvants and autoimmunity: now time for reconsideration? *Lupus.* 21: 217-222.

Xu H., Dawson R., Forrester J.V., Liversidge J. (2007) Identification of novel dendritic cell populations in normal mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 1701–1710.

Xu H., Koch P., Chen M., Lau A., Reid D.M., Forrester J.V. (2008) A clinical grading system for retinal inflammation in the chronic model of experimental autoimmune uveoretinitis using digital fundus images. *Exp Eye Res.* 87: 319-326.

Zhou R., Horai R., Silver P.B., Mattapallil M.J., Zárata-Bladés C.R., Chong W.P., Chen J., Rigden R.C., Villasmil R., Caspi R.R.(2012) The living eye "disarms" uncommitted autoreactive T cells by converting them to Foxp3(+) regulatory cells following local antigen recognition. *J Immunol.* 188: 1742-1750.

Zierhut M., Stübiger N., Siepmann K., Deuter C.M. (2005) MMF and eye disease. *Lupus.* 14 (Suppl 1): 50-54.

PŘÍLOHY